

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Metabolização de glicose e xilose por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante após deleção do gene *ROD1*

Trabalho apresentado ao Curso de
Graduação de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina
como pré-requisito para obtenção do título
de bacharel em Ciências Biológicas.

Graduando: Eike Hirsch
Orientador: Boris U. Stambuk
Co-orientadora: Angela Alves dos Santos

Florianópolis
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Cláudia e Estênio, pela educação e carinho, sobretudo por serem sempre minhas referências de persistência naquilo pelo que vale a pena lutar. Também à companhia e companheirismo do meu irmão Estefânio, desde o início de minha graduação.

Agradeço à minha namorada Gabriela, cujo apoio, amor e ajuda foram indispensáveis ao longo desse tempo. Sua presença tornou mais amena essa jornada.

Agradeço aos meus amigos que conheci ao longo da graduação, presenteando-me com lembranças e amizades incríveis.

Agradeço ao meu orientador Prof^o Dr. Boris Stambuk e à minha co-orientadora Angela Alves dos Santos pela oportunidade, assim como pela paciência e conhecimento. Ademais, a todos os membros e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras pelo convívio e ensinamentos, fazendo dele um ambiente de trabalho prazeroso.

Agradeço ao CNPq e FINEP pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço a todos e todas que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento desse trabalho. Meu mérito é tanto quanto de vocês.

“Nunca esqueça o que você é. O resto do mundo nunca se esquecerá. Vista isso como uma armadura e isso nunca poderá ser usado para machucar você.”

(Tyrion Lannister)

RESUMO

Na biomassa lignocelulósica, como a palha ou bagaço da cana-de-açúcar, a xilose constitui o segundo açúcar mais abundante. No entanto, essa pentose não é fermentada eficientemente por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura empregada na produção industrial de álcool combustível. A captação desta pentose por *S. cerevisiae* é realizada por uma família de transportadores de hexose conhecidos como *HXT*. Dentre esses, o transportador de baixa afinidade *HXT1* foi o escolhido para ser utilizado no presente estudo por permitir a maior atividade de transporte de xilose na presença de glicose, quando comparado aos outros membros da família *HXT*. Entretanto, muitos transportadores presentes na membrana plasmática são alvos de ubiquitinação, realizada pela proteína *RSP5*, acarretando na endocitose das permeases para posterior degradação nos vacúolos. Para que a proteína *RSP5* possa ubiquitinar os transportadores, esta deve ser recrutada até a membrana por uma família de proteínas chamadas α -arrestinas. Estudos sugerem que a endocitose e ubiquitinação do transportador *HXT1* é mediada por uma α -arrestina específica chamada *ROD1*, cuja atividade possivelmente é induzida por baixas concentrações ou ausência de glicose no meio. Portanto, o presente trabalho estudou a influência da *ROD1* na capacidade do transportador *HXT1* de permitir o consumo e fermentação de xilose. Para tal, foi deletado o gene *ROD1* na linhagem laboratorial DLG-K1T1 (linhagem *hxt*-null capaz de fermentar a xilose, mas que expressa apenas o *HXT1*), sendo posteriormente analisados os perfis de crescimento e fermentação de glicose, xilose, ou combinações destes dois açúcares. Os resultados obtidos mostram que a deleção da α -arrestina *ROD1* permitiu um maior consumo e crescimento em xilose pela linhagem expressando o *HXT1*, tanto em meios contendo apenas xilose, ou misturas de xilose e glicose. No entanto, durante fermentações em batelada seja com altas densidades celulares, ou com altas concentrações de xilose e/ou glicose, não foi possível observar nenhuma vantagem na linhagem deletada nesta α -arrestina. Portanto, nossos resultados sugerem que provavelmente a α -arrestina *ROD1* não seja a única responsável por promover a estabilidade do transportador *HXT1* durante a fermentação em batelada de xilose.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; *ROD1*; *HXT1*; xilose; fermentação;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pré-tratamento de polissacarídeos da lignocelulose.....	17
Figura 2 - Estrutura da lignocelulose.....	18
Figura 3 - Rota metabólica de xilose.....	20
Figura 4 - Endocitose do transportador <i>HXT1</i> mediada pela arrestina <i>ROD1</i>	25
Figura 5: Obtenção do módulo de deleção.....	30
Figura 6: Deleção do gene <i>ROD1</i>	32
Figura 7: Confirmação da deleção do gene <i>ROD1</i> na linhagem DLG-K1T1.....	37
Figura 8: Crescimentos aeróbicos das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i> em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose como fonte de carbono.....	38
Figura 9: Crescimentos aeróbicos das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i> em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono.....	39
Figura 10: Crescimentos aeróbicos das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i> em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose xilose como fontes de carbono.....	41
Figura 11: Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	42
Figura 12: Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose realizada pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	43
Figura 13: Co-fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose e xilose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	45
Figura 14: Fermentação em batelada com baixa concentração celular de meios sintéticos sem uracila contendo 5% de glicose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	46
Figura 15: Fermentação em batelada com baixa concentração celular de meios sintéticos sem uracila contendo 5% de xilose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	47
Figura 16: Co-fermentação em batelada com baixa concentração celular de meios sintéticos sem uracila contendo 5% de glicose e 5% xilose como fonte de carbono realizada pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de leveduras utilizadas.....	27
Tabela 2: Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados.....	30
Tabela 3: Consumo e velocidade de consumo de xilose durante o crescimento em 20 g/L de xilose das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 $\Delta rod1$	40
Tabela 4: Consumo e velocidade de consumo de xilose durante o crescimento em 20 g/L de glicose e xilose das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 $\Delta rod1$	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Etanol de primeira geração.....	15
2.2 Etanol de segunda geração.....	16
2.3 Biomassa lignocelulósica.....	17
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.5 Metabolização da xilose.....	19
2.6 Transportadores <i>HXT</i>	21
2.7 Ubiquitinação.....	23
2.8 α -arrestinas e <i>ROD1</i>	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Meios de cultura.....	27
4.2 Linhagens de levedura utilizadas.....	27
4.3 Técnicas de Biologia Molecular.....	27
4.3.1 Extração de DNA genômico.....	27
4.3.2 Reação em cadeia de Polymerase (<i>PCR</i>)	28
4.3.3 Eletroforese em gel de agarose.....	28
4.3.4 Obtenção do módulo de deleção.....	29
4.3.5 Concentração dos fragmentos de DNA amplificados.....	31
4.3.6 Deleção do gene <i>ROD1</i>	31
4.3.7 Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	32
4.4 Determinação do crescimento celular.....	33
4.5 Ensaio fermentativo.....	34
4.6 Determinação dos substratos e produtos de crescimento celular e fermentação.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

5.1	Modificações genômicas em linhagens de <i>S. cerevisiae</i>.....	35
5.2	Análise dos crescimentos em glicose e/ou xilose.....	37
5.3	Análise da performance fermentativa em batelada com alta concentração celular.....	42
5.4	Análise da performance fermentativa em batelada com alta concentração de açúcar...	45
6.	CONCLUSÃO.....	50
	PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, aumentou-se a preocupação a respeito das consequências que a indústria em expansão pode gerar sobre o meio ambiente. Os combustíveis fósseis, por serem amplamente usados na sociedade, passaram a ser alvo de estudos em decorrência de seu uso (GAFFINEY *et al.*, 2009). A utilização deles pode gerar, como produto da sua combustão, contaminantes gasosos (BRAUN *et al.*, 2003). Apesar de esses gases serem produzidos por eventos naturais, sua emissão é acentuada pela contribuição humana (GUARIEIRO *et al.*, 2011). Estes últimos autores também apontam as consequências desse aumento, como eventos de inversões térmicas, possível agravamento do efeito estufa – e seus efeitos ecossistêmicos – assim como uma maior incidência de problemas respiratórios em centros urbanos. Além disso, é importante destacar que os combustíveis fósseis são um recurso energético limitado.

Dadas as problemáticas de se depender desse recurso energético, buscaram-se formas alternativas de obtenção de energia. Recursos renováveis são fontes de extração de energia cuja renovação ocorre naturalmente. Exemplos são usinas eólicas, painéis solares, usinas marítimas (convertendo a energia mecânica das marés) entre outros (VICHÍ *et al.*, 2009). Ademais, uma fonte de energia alternativa promissora é a biomassa lignocelulósica (BERMANN, 2008), a qual se refere à fração sólida (parede celular) da matéria orgânica de uma planta. Neste caso, a energia é armazenada principalmente na forma de carboidratos, que podem ser convertidos em etanol (HIMMEL *et al.*, 2007). Como o nome sugere, a lignocelulose é composta por emaranhados de lignina, celulose e hemicelulose. Esta última compreende cerca de 25% da lignocelulose, e tem como principal carboidrato a pentose xilose (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, empregada nos processos fermentativos industriais, não consegue fermentar naturalmente a xilose. Entretanto, se considerarmos um cenário industrial onde 90% do total dessa pentose presente na hemicelulose pudesse ser fermentado, estima-se um aumento de 50% na produção de etanol proveniente de cana-de-açúcar – 47 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar a mais do que os 80 litros produzidos atualmente (STAMBUK *et al.*, 2008). Portanto, é fundamental o desenvolvimento de uma linhagem dessa levedura que consiga fermentar xilose com eficiência (FERREIRA, 2015). A levedura *S. cerevisiae* é o organismo-plataforma empregado para ser o fermentador pelo fato de ser de fácil manutenção em ciclos fermentativos e estar adaptada ao estresse de variações no meio como de pH, temperatura,

metabólitos e contaminação com outros organismos (TESFAW *et al.*, 2014). Somado a isso, essa levedura foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma sequenciado, fato que auxiliou na manipulação genética deste (GOFFEAU *et al.*, 1996).

Para que a xilose seja usada como substrato para fermentação, primeiramente é necessário que ela seja internalizada pela célula (LAGUNAS *et al.*, 1993). Apesar da *S. cerevisiae* não possuir genes endógenos que expressam transportadores específicos de xilose, a captação desta pentose ainda é realizada mediante transportadores de hexose (chamados de *HXT*), porém com uma menor eficiência (MATSHUSHIKA *et al.*, 2009a). Diversas permeases endógenas, incluindo transportadores de hexose, são alvos de endocitose - processo dependente de ubiquitinação – para serem posteriormente degradadas nos vacúolos (HICKE, 1997). Em *S. cerevisiae*, uma proteína responsável para realizar a ubiquitinação de transportadores é a *RSP5*. Entretanto, para que os transportadores sejam ubiquitinados são necessárias proteínas adaptadoras endocíticas, conhecidas como α -arrestinas (ARTs), que funcionam como recrutadoras intermediárias do complexo *RSP5* (NIKKO *et al.*, 2008). Dentre estas α -arrestinas, está a *ART4*, também conhecida como *ROD1*, uma proteína envolvida na endocitose e posterior degradação do transportador *HXT1* (O'DONNELL *et al.*, 2015), transportador que permite a maior produção de etanol durante a co-fermentação de glicose e xilose (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Desta forma, a deleção do gene *ROD1* é uma abordagem promissora no intuito de desenvolver uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de manter o transportador *HXT1* permanentemente em sua membrana e, consequentemente, otimizar sua capacidade fermentativa de xilose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol de primeira geração

Os biocombustíveis gerados de fontes primárias, como açúcar, amido, óleo vegetal ou gordura animal, são classificados como de primeira geração. São provenientes de fontes variadas, como milho, beterraba, trigo, mandioca e cana-de-açúcar. O Brasil sustenta a posição de líder mundial de tecnologia e produção de bioetanol oriundo da cana-de-açúcar (FAPESP, 2007). Contudo, a dependência de terras agriculturáveis para o cultivo dessa biomassa tem fomentado discussões sobre a eficácia do uso do etanol de primeira geração como fonte energética, já que o uso dessas terras compete geograficamente com a produção

do setor alimentício para humanos e animais. Todavia, a produção de biocombustíveis tem sido analisada pela Avaliação do Ciclo de Vida (*LCA, Life Cycle Assessment*), evidenciando uma relevante diminuição no consumo de combustíveis fósseis e também uma queda na emissão de poluentes atmosféricos (MARGEOT *et al.*, 2009; ZAH *et al.*, 2010; BERNDES *et al.*, 2013).

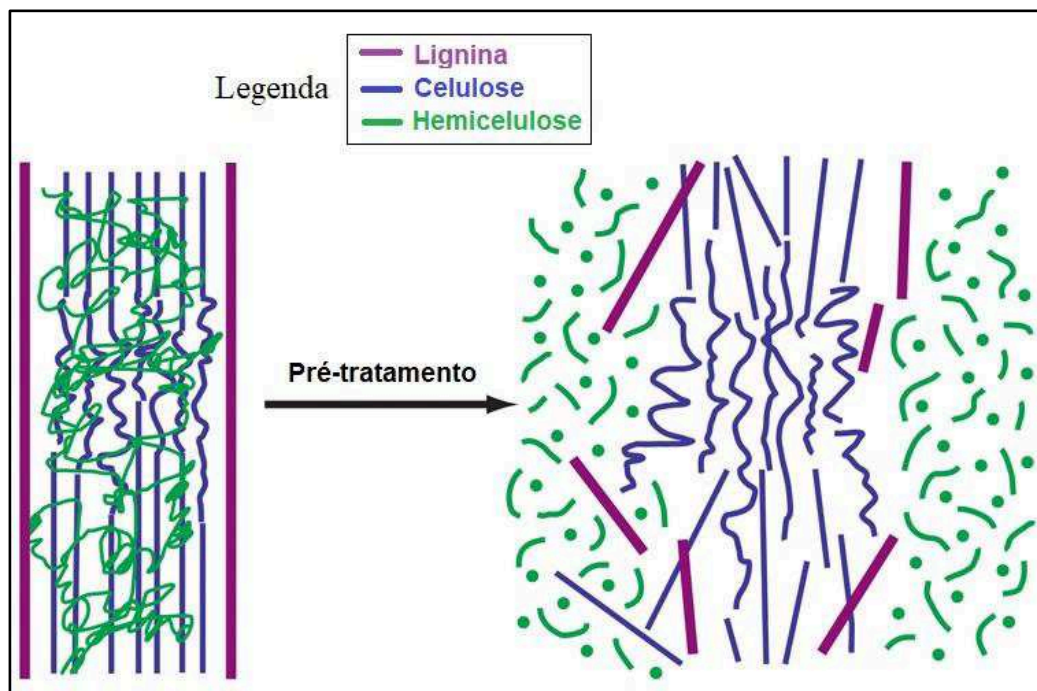
Utilizando o caldo da cana-de-açúcar, obtém-se o etanol de primeira geração. Este caldo possui 15% de sacarose (dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outra de frutose), enquanto que a biomassa contém 15% de fibras. Após ser tratado, o caldo é submetido à fermentação por uma linhagem industrial específica de *S. cerevisiae*, culminando na destilação do mosto e obtenção do álcool combustível (SIMS & TAYLOR, 2008; ZAH *et al.*, 2010).

2.2 Etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração diz respeito ao biocombustível oriundo da porção não alimentar da biomassa, logo, a parte lignocelulósica. É de grande importância esse processo devido ao aproveitamento energético da biomassa, que é comumente tratada como resíduo agrícola, sendo uma alternativa promissora, mas ainda com alguns desafios a serem superados (HIMMEL *et al.*, 2007; SIMS *et al.*, 2008).

Para fragmentar a estrutura lignocelulósica a fim de separar a hemicelulose do restante da lignocelulose, é necessário um pré-tratamento (Figura 1). Para que os polissacarídeos hemicelulósicos sejam reduzidos em açúcares menores, para a levedura conseguir metabolizá-los, é necessário hidrolisar, química ou enzimaticamente, a parede celular. Essa hidrólise necessita do uso de hidróxido de cálcio para neutralizar a solução antes de ocorrer a fermentação, mas esse composto químico não é reutilizável, fato este que encarece o processo. Esforços são feitos continuamente a fim de aperfeiçoar e contornar essa questão (RUBIN, 2008; BERNDES *et al.*, 2013).

Figura 1: Pré-tratamento de polissacarídeos da lignocelulose. Representação esquemática evidenciando a separação dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina que compõem a biomassa lignocelulósica. O pré-tratamento visa a remoção da hemicelulose dessa estrutura para, em seguida, haver a hidrólise desse polissacarídeo em carboidratos mais simples, como a xilose.



Fonte: Adaptado de Mosier *et al.*, 2005.

Em 2013, iniciou-se na Itália o funcionamento da primeira usina mundial de etanol de segunda geração, abrangendo desde a aquisição da matéria-prima até a fermentação, tendo potencial de produzir 60 mil toneladas de etanol celulósico a partir de 270 mil toneladas de biomassa (BETA RENEWABLES, 2014). A usina consegue reciclar 100% da água utilizada além de produzir 13 MW de energia elétrica a partir da queima da lignina excedente do processo. No Brasil, foi fundada a primeira usina comercial de bioetanol de segunda geração em 2014, em São Miguel dos Campos, Alagoas. A tecnologia usada é licenciada pela mesma empresa da usina italiana supracitada, podendo produzir 82 milhões de litros de etanol por ano, usando da palha e bagaço de cana-de-açúcar que não competem com a produção alimentícia (GRANBIO, 2014).

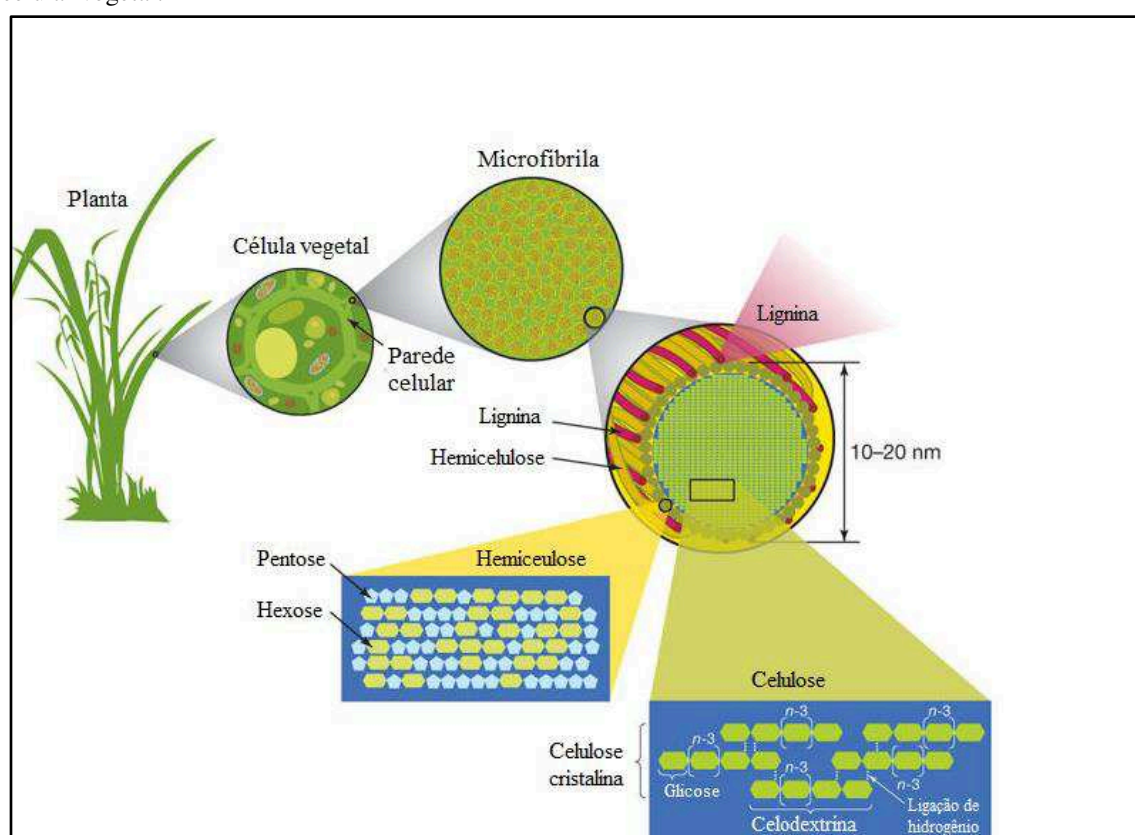
2.3 Biomassa lignocelulósica

Por ser um recurso abundante, renovável e rico em carboidratos, a biomassa lignocelulósica pode ser uma fonte energética alternativa de grande importância (HIMMEL *et al.*, 2007). Pelo fato de compor a porção não-alimentar das plantas – resíduos, bagaços de cana-de-açúcar, palha, florestas de curta duração - esse recurso não compete com outros

setores da indústria. Como demonstrado na figura 2, a biomassa lignocelulósica pode ser dividida em três partes: celulósica, hemicelulósica e lignina.

A celulose é um polímero constituído exclusivamente por moléculas de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas ($\beta 1,4$ -), e é o principal componente da parede celular vegetal. A hemicelulose é composta por pentoses e hexoses, sendo a xilose o seu monossacarídeo mais abundante. A lignina, por sua vez, é um polímero que confere estrutura, resistência e impermeabilidade à planta (RUBIN, 2008).

Figura 2: Estrutura da lignocelulose. O principal componente dessa estrutura é a celulose, que consiste de polímeros de glicose. Hemicelulose é formada por pentoses e glicoses. A lignina é composta de álcoois fenólicos. Esses três componentes, organizados em microfibras, conferem rigidez e estabilidade à parede celular vegetal.



Fonte: Adaptado de RUBIN, 2008.

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Usada há séculos no âmbito da panificação e fermentação de vinhos e cerveja, atualmente esse organismo é empregado para a fermentação de açúcares em etanol na indústria fermentativa. Por ter seu genoma já bem conhecido, assim como ter suas rotas metabólicas bem elucidadas (ZHANG *et al.*, 2011), tem se tornado o principal organismo-

plataforma para o desenvolvimento da pesquisa em fermentação de bioetanol. Seus atributos atendem aos pré-requisitos necessários para atuar na fermentação de larga escala na indústria como: suportar estresses osmóticos do meio (devido aos açúcares), variações de temperatura e de pH e tolerar alta concentração do próprio produto fermentado (etanol) - vantagens que favorecem a levedura em relação a possíveis contaminações em reatores abertos (MATSUSHIKA *et al.*, 2009a).

Entretanto, mesmo sendo um eficiente fermentador de glicose (uma hexose), essa levedura não consegue fermentar naturalmente pentoses como a xilose, o segundo açúcar mais abundante da biomassa vegetal. Apesar de possuir os genes que expressam as enzimas iniciais (xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulose cinase) da cadeia metabólica que converte o carboidrato em etanol, suas atividades são baixas, exigindo que manipulações genéticas sejam feitas para resultar numa maior atividade metabólica e cinética. Já existem linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes que conseguem fermentar a xilose presente no meio, mas tal atividade é limitada devido a um desbalanço de cofatores (NAD⁺ e NADPH) oriundos da fermentação (MATSUSHIKA *et al.*, 2009a).

2.5 Metabolização da xilose

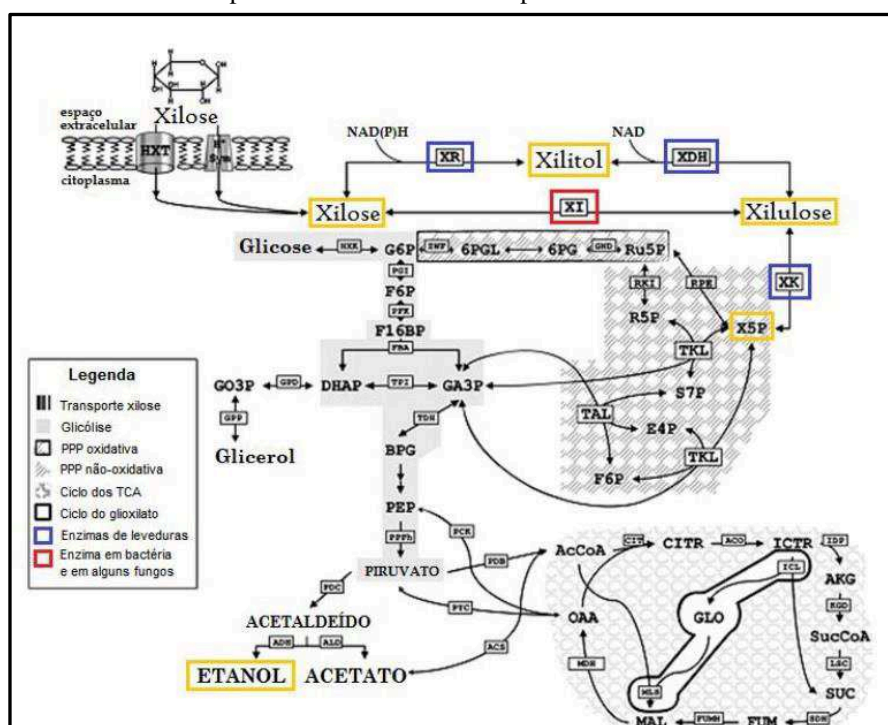
A incorporação e a fermentação do açúcar xilose ocorre naturalmente em algumas bactérias, leveduras e fungos (JEFFRIES, 1983). Em muitos casos, esse carboidrato entra na célula através de co-transportadores H⁺/açúcar, os quais têm alta afinidade pela xilose (SALOHEIMO *et al.*, 2007). Entretanto, no caso da *S. cerevisiae*, esta levedura não possui os genes codificantes para esses transportadores específicos de xilose em seu genoma, sendo assim, sua entrada precisa ser feita via transportadores de hexoses, como a glicose. Contudo, segundo Stambuk e colaboradores (2008), estes transportadores possuem maior afinidade à glicose do que à xilose.

A entrada de xilose na levedura se dá por meio de proteínas transmembrana de transporte codificadas pela família de genes *HXT* (KRUCKEBERG & BISSON, 1990; KRUCKEBERG *et al.*, 1999). Dentro da família, há vários genes que codificam transportadores que podem ser divididos em transportadores que possuem alta afinidade pela glicose (*HXT2*, *HXT6* e *HXT7*), ativos em baixas concentrações de glicose; e transportadores de baixa afinidade (*HXT1*, *HXT3* e *HXT4*), ativos em altas concentrações de glicose (BISSON *et al.*, 1993).

Assim que entrar na célula, a xilose precisa seguir uma cadeia metabólica a fim de ser convertida em etanol, como abordado na figura 3. Primeiramente, ela sofrerá redução pela enzima xilose redutase (XR), tornando-se xilitol. Em seguida, o xilitol é oxidado em xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase (XDH). Posteriormente, a enzima xilulose cinase (XK) fosforila o xilitol em xilulose-5-fosfato (X5P). Feito isso, a xilulose-5-fosfato entrará na via das pentoses fosfato, podendo ser convertida por transcetolases e transaldolases em intermediários glicolíticos como o gliceraldeído-3-fosfato (GAP3) e frutose-6-fosfato.

Na rota Embden-Meyerhof-Parnas (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1991), esses intermediários glicolíticos são convertidos em piruvato. Quando em condições anaeróbias, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase (PDC) em acetaldeído e a enzima álcool desidrogenase (ADH) enfim converte-o em álcool. Uma rota alternativa existente pode ser utilizada através da enzima xilose-isomerase (XI), que converte xilose diretamente em xilulose, presente em algumas bactérias (MISHRA & SINGH, 1993) e alguns fungos anaeróbios (KUYPER *et al.*, 2003), mas não naturalmente em leveduras.

Figura 3: Rota metabólica de xilose. Estão evidenciadas em azul as três enzimas iniciais no ciclo: XR (xilose redutase), que reduz a xilose em xilitol; a XDH (xilitol desidrogenase), que oxida xilitol em xilulose; e a XK (xilulose cinase) que fosforila esse último em xilulose-5-fosfato. Em amarelo estão evidenciados a xilose, os metabólitos das enzimas supracitadas e o etanol como produto final.



Fonte: Adaptado de Chu & Lee, 2007.

2.6 Transportadores *HXT*

Para que um carboidrato possa ser metabolizado e convertido em bioetanol através da fermentação, primeiramente é necessária sua captação do meio (LAGUNAS, 1993). No caso da xilose, há transportadores de membrana específicos responsáveis por internalizá-la (SALOHEIMO *et al.*, 2007). Especificamente no genoma da *S. cerevisiae*, contudo, não estão presentes genes endógenos que codificam tais transportadores. Porém, a levedura ainda é capaz de captar aquele açúcar através de transportadores de hexose, mas com baixa eficiência devido à preferência que eles têm para com a glicose (BERTILSSON *et al.*, 2008).

A *S. cerevisiae* apresenta naturalmente em seu genoma uma família de 20 genes que codificam para proteínas responsáveis pela captação de hexoses (BOLES & HOLLENBERG, 1997; OREB *et al.*, 2012; SALOHEIMO *et al.*, 2007). Apenas 17 são específicos para transporte desses carboidratos, sendo denominados *HXT1-HXT17*, e só sete (*HXT1-HXT7*) são necessários para internalização de glicose, demais hexoses (CONANT & WOLFE, 2007; ELBING *et al.*, 2004; LIN & LI, 2011) e xilose (HAHN-HAGERDAL & GARGONYI, 2003; WAHLBOM *et al.*, 2003; YOUNG *et al.*, 2010).

Os transportadores *HXT1* e *HXT3-HXT7* possuem semelhança estrutural; devido a isso, foi sugerido por Lin & Li (2011) que *HXT3*, *HXT6* e *HXT7* originaram-se de um mesmo processo de duplicação de genes. O mesmo pode ter acontecido com o grupo de genes formado por *HXT1*, *HXT4* e *HXT5* (KELLIS *et al.*, 2004). Apesar da similaridade estrutural, as proteínas codificadas pelos genes supracitados apresentam características diferentes: afinidade pelo substrato e perfil de expressão de acordo com concentração de açúcares no meio.

Categoricamente, é possível separar os transportadores *HXT* como: um grupo de baixa afinidade por glicose, *HXT1* e *HXT3*, ativos em altas concentrações do carboidrato. Especificamente, a expressão do *HXT1* só acontece em concentrações $\geq 1\%$ de glicose (OZCAN & JOHNSTON, 1995). No que diz respeito aos transportadores *HXT2*, *HXT4* e *HXT5*, estes possuem média afinidade pela glicose, sendo os dois primeiros reprimidos em altas concentrações do substrato, enquanto que o *HXT5* é conhecido pela sua expressão ser iniciada quando a glicose é exaurida do meio (BERTILSSON *et al.*, 2008; DIDERICH *et al.*, 1999; OZCAN & JOHNSTON, 1995). Por último, os genes *HXT6* e *HXT7* codificam seus respectivos transportadores (*HXT6* e *HXT7*) em condições de baixa concentração de

glicose, ausência desta e até mesmo em meios com fontes de carbono não fermentáveis como glicerol e etanol, sendo reprimidos em condições de alta concentração de glicose (DIDERICH *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2013).

Além do conhecimento sobre a preferência que os transportadores *HXT* têm para com a glicose, é sabido que a afinidade que estes possuem pela xilose é 100 vezes menor do que para com a glicose, e que em meios contendo ambos os carboidratos, o consumo de xilose só começa quando os níveis de hexoses estão muito baixos. Especificamente se tratando do transportador HXT1, os valores de *K_m* para glicose e xilose são, respectivamente: 100 mM e 880 mM (BERTILSSON *et al.*, 2008; HAMACHER *et al.*, 2002; JOJIMA *et al.*, 2010; MATSUSHIKA & SAWAYAMA, 2011; SALOHEIMO *et al.*, 2007; SUBTIL & BOLES, 2012).

A linhagem de *S. cerevisiae* DLG-K1 tem sobre-expressas as principais enzimas de metabolização de xilose (xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulose cinase). Além disso, possui o diferencial de ter os genes *HXT1-HXT7* deletados (*hxt-null*), portanto, sendo impossibilitada de expressar os principais transportadores de glicose e xilose, inviabilizando seu crescimento em meios com esses açúcares. Devido ao fato da internalização de açúcares do meio ser um importante fator limitante na conversão de biomassa lignocelulósica em bioetanol (MATSUSHIKA *et al.*, 2009b; RUNQUIST *et al.*, 2009; Van VLEET & JEFFRIES, 2009; YOUNG *et al.*, 2012), Gonçalves e colaboradores (2014), construíram linhagens a partir da DLG-K1 para avaliar separadamente a eficiência de captação de xilose de cada transportador (HXT1, HXT2, HXT5 e HXT7). Uma das linhagens construídas é referida como DLG-K1T1: é isogênica à DLG-K1, logo, possui as enzimas de metabolização de xilose sobre-expressas, mas diferindo-se pelo fato de ter o gene *HXT1* sobre-expresso, apesar dos outros genes da família *HXT* continuarem deletados. O ensaio de fermentação em xilose, realizado por esse mesmo grupo de pesquisadores empregando a DLG-K1T1, mostrou que a linhagem foi incapaz de metabolizar a pentose, consumindo menos de 5% do substrato. Entretanto, em co-fermentação de glicose e xilose, foi mostrado que houve não apenas o consumo total da glicose, assim como também 57% da xilose do meio foi consumida.

O fato da xilose não ter sido transportada pelo Hxt1 em meio contendo apenas essa pentose possivelmente se deve à degradação do transportador em vacúolos através de endocitose - processo intermediado por ubiquitinação do transportador – induzido pela ausência de glicose. É sabido que os transportadores *HXT2*, *HXT6* e *HXT7* (expressos em

baixa concentração ou ausência de glicose) são regulados negativamente pós-traducionalmente através de um processo de internalização e degradação em vacúolo celular em células crescidas em meio com alta concentração de glicose (KRUCKEBERG *et al.*, 1999; KRAMPE *et al.*, 1998). De forma contrária, segundo Snowden e colaboradores (2009), células crescidas em glicose apresentaram endocitose e degradação do transportador *HXT3* (ativo em alta concentração) após serem transferidas a um meio sem glicose. Finalmente, descobriu-se que o transportador de baixa afinidade *HXT1* também é suscetível à degradação mediada por ubiquitinação. Roy e colaboradores (2014), revelaram que essa permease é degradada em condições de pouca ou ausência de glicose, sendo essa regulação negativa dependente de ubiquitinação.

2.7 Ubiquitinação

A ubiquitinação é um importante método de controlar a estabilidade, função e localização intracelular de muitas proteínas, sendo presente em todos os organismos eucariotos. Dessa forma, a célula consegue definir quais proteínas membranares são mais eficientes em relação às condições do meio na qual a célula está inserida. Uma das principais funções conhecidas desse processo consiste em marcar proteínas da membrana plasmática para serem internalizadas e, através de uma via endocítica, sofrer posterior degradação no vacúolo (HORÁK, 2003).

Essa marcação para internalização da proteína envolve a transferência de uma molécula de ubiquitina à proteína alvo, em resíduos de lisina específicos, realizada pelas enzimas E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) e E3 (ubiquitina ligase), sendo esta última geralmente responsável pelo reconhecimento específico da proteína alvo. Segundo Horák (2003), as proteínas podem ser marcadas uma única vez, ou também pode haver adição de outras moléculas de ubiquinas ligadas à primeira, processo chamado de poliubiquitinação. Como forma de reutilizá-las, as ubiquitinas podem ser recicladas através da desubiquitinação de proteínas marcadas (WILKINSON, 1997).

Em relação às proteínas da membrana plasmática de leveduras, uma única molécula de ubiquitina pode ser suficiente para desencadear a internalização delas - apesar de cadeias de duas ou três ubiquitinas também poderem existir, sendo ligadas através do resíduo de lisina 63 (HORÁK, 2003). No caso de proteínas constitutivamente internalizadas mediante endocitose, a taxa de internalização pode variar por várias causas, como estarem ligadas a

substratos, a concentração de nutriente no meio, temperatura ou condições de stress. A ubiquitinação de muitas proteínas de membrana requer a proteína ubiquitina ligase *RSP5*. Ela é codificada pelo gene *RSP5*, sendo a proteína que é melhor conhecida dentre a subfamília de ubiquitina ligases (E3) (PAIVA *et al*, 2009).

2.8 α -Arrestinas e *ROD1*

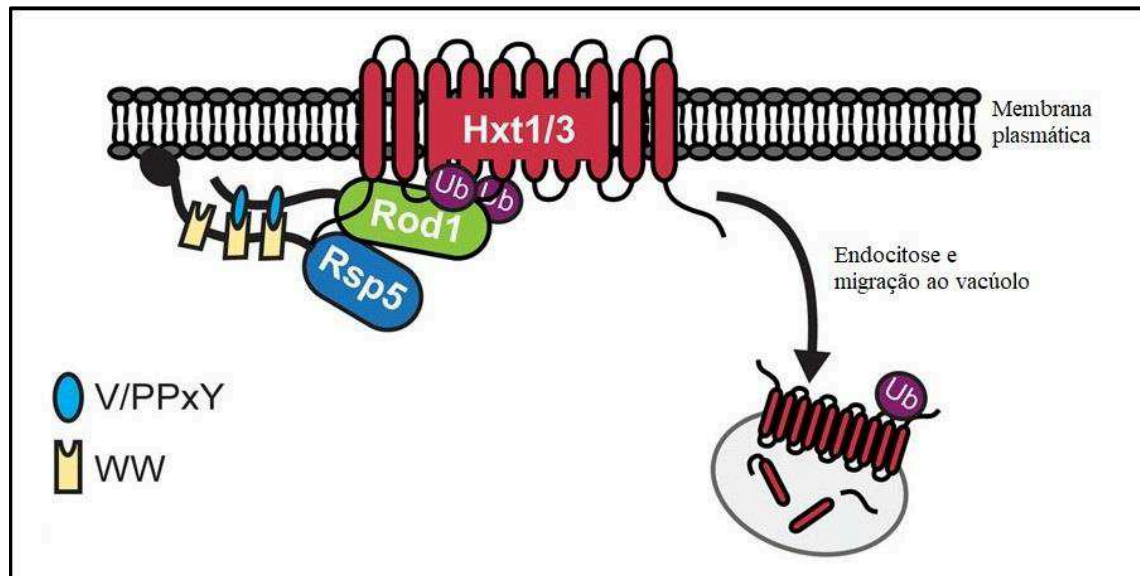
Na levedura *S. cerevisiae*, diversas permeases endógenas presentes na membrana plasmática, incluindo transportadores de carboidratos, são alvos de endocitose realizado pelo complexo protéico *RSP5* (HICKE, 1997), para posteriormente serem degradadas. Entretanto, os transportadores que são submetidos a essa regulação não possuem o domínio (ou região motivo) para serem reconhecidos pela *RSP5* (ALVARO *et al*, 2014). Contudo, a endocitose dessas proteínas integrais de membrana são mediadas por uma família de proteínas adaptadoras endocíticas chamadas α -arrestinas (ARTs), que funcionam como recrutadoras da *RSP5* (NIKKO *et al*, 2008). Essa família possui 14 membros, que possuem como característica a sua porção N-terminal ter uma região motivo ligante à proteína transportadora, e a sua porção C-terminal possuir a região motivo que é reconhecida pela *RSP5* (LIN *et al*, 2008). Ademais, segundo Llopis-Torregrosa e colaboradores (2016), as alfa-arrestinas possuem especificidade a determinados subgrupos de permeases de membrana e agem em resposta a estímulos específicos.

Roy e colaboradores (2014) realizaram um estudo avaliando a ubiquitinação (e endocitose) do transportador *HXT1* induzida pela ausência de glicose. Os resultados apontaram que a ausência da glicose induz a endocitose do transportador, mediado provavelmente por ubiquitinação em resíduos de lisina localizados nas posições 12 e 39 da porção N-terminal do transportador. Dentre a família das arrestinas está a *ART4*, também conhecida como *ROD1*, expressa pelo gene *ROD1*. O'Donnel e colaboradores (2015) estudaram a influência da arrestina *ROD1* na ubiquitinação, e consequente endocitose, do transportador *HXT1* em meios contendo 2-deoxy-glicose, um análogo da glicose que impede a metabolização de glicose (PELICANO *et al.*, 2006). Foi demonstrado que essa arrestina pode estar envolvida no recrutamento da proteína *RSP5* até o transportador *HXT1*, na ausência da metabolização de glicose, culminando na endocitose dele (Figura 4).

Desta forma, a proteína adaptadora *ROD1* é um alvo de estudo interessante no que diz respeito ao desenvolvimento de uma linhagem aperfeiçoada de *Saccharomyces*

cerevisiae que consiga manter o transportador *HXT1* permanentemente em sua membrana plasmática através da inibição de sua ubiquitinação e consequente endocitose.

Figura 4: Endocitose do transportador *HXT1* mediada pela arrestina *ROD1*. É sugerido que a *ROD1* tenha papel no recrutamento da proteína *RSP5*, que possui a função de ubiquitinar o transportador *HXT1*, acarretando sua endocitose. Os círculos azuis são as regiões específicas da arrestina que se ligam à região motivo WW presente na proteína *RSP5*, possibilitando seu recrutamento até o transportador na membrana plasmática.



Fonte: Adaptado de O'Donnel *et al.*, 2015

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* com o gene *ROD1* deletado, a fim de evitar a endocitose intermediada por ubiquitinação e consequente degradação do transportador *HXT1* na ausência de glicose.

3.2 Objetivos específicos

- Deletar o gene *ROD1* na linhagem de *S. cerevisiae* recombinante DLG-K1T1 (linhagem com sobre-expressão dos genes responsáveis para a metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*), com os principais genes que codificam para os transportadores de xilose deletados (*hxt*-null), com a exceção do gene *HXT1* que é sobre-expresso num plasmídeo de expressão.
- Analisar o perfil de crescimento e performance fermentativa da linhagem recombinante construída, bem como de sua parental, em meios contendo glicose e/ou xilose como fontes de carbono.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultura

Os meios utilizados para cultivo das leveduras foram: meios ricos YP (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona), meios sintéticos (6,7 g/L de base nitrogenada), meios sintéticos sem uracila (6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos, suplementado com 2 g/L de meio Drop Out sem a base nitrogenada uracila – Sigma Aldrich). Os meios foram suplementados com a fonte de carbono de interesse (20 g/L de maltose, glicose ou xilose), tendo o pH ajustado para 5,0 com HCl ou NaOH. No preparo de meios sólidos foi adicionado 20 g/L de ágar. Quando necessário, os meios foram suplementados com 200 mg/L de Geneticina (G418 – Sigma) ou 0,5 mg/L de Aureobasidina-A (Takara-Bio), sendo em condições assépticas. A esterilização dos meios foi feita através de calor úmido (usando autoclave a 120 °C por 15 min) ou por filtração com membranas de nitrocelulose com 0,22 µm de porosidade.

4.2 Linhagens de leveduras utilizadas

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas

Linhagens	Genótipo ou descrição	Fonte
BSY21-34B3	<i>MATα loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::iSUC2 his3Δ1 trp1-289 MAL2-8c</i>	MÜLLER (2013)
DLG-K1	<i>MATα hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 gal2Δ ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 AUR1::pAUR-XKXDHXR</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> (2014)
DLG-K1T1	Isogênica à DLG-K1 + pPGK- <i>HXT1</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> (2014)
DLG-K1T1Δ <i>rod1</i>	Isogênica à DLG-K1T1 mas <i>rod1Δ::LoxP-KanMX-LoxP</i>	Este trabalho

4.3 Técnicas de Biologia Molecular

4.3.1 Extração de DNA genômico

Para extrair o DNA das leveduras, as células foram pré-crescidas em 3 mL de meio líquido YP contendo 20 g/L de maltose como fonte de carbono por 24 horas a 28 °C sendo

agitados em 160 rpm. Em seguida, houve centrifugação da cultura (3.000 g por 5 min) - com o sobrenadante sendo descartado – e, para as células, foi empregado o kit comercial de extração de DNA de leveduras (YeastStar Genomic DNA Kit™, Zymo Research) seguindo instruções do fabricante. Posteriormente, o DNA genômico foi ressuspensão em 60 uL de água deionizada (MiliQ) autoclavada, finalizando com a amostra armazenada em freezer a -20 °C para futura utilização.

4.3.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

A fim de se obter o módulo de deleção, foram aplicadas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para tal, empregou-se a enzima de alta afinidade Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) e o termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf). As especificações usadas para as reações de PCR foram: 50ng de DNA, Tampão Phusion HF® 5x (F518), dNTPs 10nM, 5uM de cada iniciador, 1 U da enzima Phusion e água deionizada para completar o volume para 600 uL. A solução total foi dividida entre 24 tubos Eppendorfs 200 uL (Eppendorf para PCR) contendo 25 uL da mistura em cada. As reações de amplificação do módulo de deleção foram realizadas no termociclador através das seguintes etapas em sequência: desnaturação inicial de 98 °C por 20 segundos; 30 ciclos de desnaturação de 98 °C por 10 segundos, anelamento dos iniciadores com temperatura de 59 °C por 20 segundos e etapa de extensão de fitas de 72 °C por 15~30 segundos/Kb; finalizando com um passo final de extensão de 72 °C por 7 min. Com o intuito de verificar as construções genômicas, também utilizaram-se reações de PCR. A enzima utilizada foi a GoTaq® DNA Polimerase (Promega). As especificações utilizadas para essas reações foram: 50 ng de DNA, Tampão Green® 5x, dNTPs 200 uM, 5 uM de cada iniciador, 0,75 U da enzima GoTaq® e água deionizada para completar o volume total de 50 uL. As reações de verificação realizadas no termociclador foram submetidas aos seguintes passos em sequência: desnaturação inicial de 95 °C por 2 min; em seguida, 30 ciclos de desnaturação de 95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores com temperatura de 50 °C por 1 min e etapa de extensão de fitas 72 °C por 30~60 segundos/Kb, finalizando com um passo final de extensão de 72 °C por 2 min.

4.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Para analisar os fragmentos de DNA obtidos através das reações de PCR foi aplicada técnica de eletroforese em gel de agarose. O gel utilizado foi composto de uma

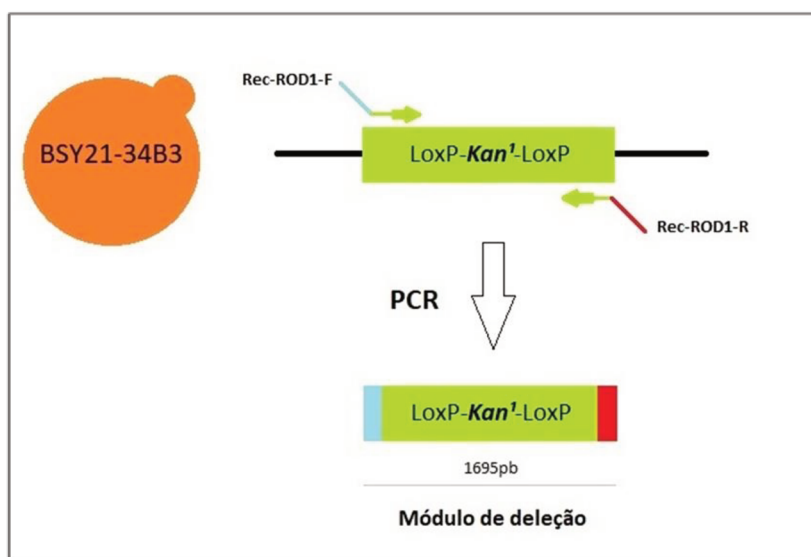
mistura de 1% de agarose em tampão TBE (45 mM Trisborato, 1mM EDTA em pH 8,0) contendo 2,5 ug/L de brometo de etídio (intercalante de DNA) – sendo o último utilizado para análise das bandas em luz ultravioleta. Posterior à obtenção dos fragmentos de DNA requeridos, aplicou-se 10 uL (diluídos em tampão de corrida 6x concentrado) da amostra em poços de gel de agarose e 6 uL do marcador de peso molecular de 1 kb ladder (BioLabs®), sendo corridos conjuntamente em poços paralelos. Logo após, o gel foi submetido à eletroforese no mesmo tampão TBE, em condições de 100 V por 60~90 min. Em seguida, houve a análise e fotografia do gel sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad).

4.3.4. Obtenção do Módulo de Deleção

Para construção do módulo de deleção, primeiramente foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2). A ferramenta auxiliar usada para desenhar iniciadores é disponível online pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) (www.idtdna.com) e o banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (www.yeastgenome.org) – este último foi empregado para obtenção das sequências de nucleotídeos das regiões desejadas no genoma das leveduras. Os iniciadores para recombinação homóloga foram desenhados para possuírem regiões homólogas a uma região do DNA alvo no genoma da levedura (aproximadamente 40 nucleotídeos), seguidos de uma sequência, de aproximadamente 20 nucleotídeos, que permitiu a amplificação do módulo de deleção da linhagem BSY21-34B3, conforme ilustrado na Figura 5 (MULLER, 2013). Além disso, também foram desenhados iniciadores para verificação das recombinações realizadas com o módulo de deleção

Para obter o módulo de deleção, foi utilizado o DNA extraído de BSY21-34B3. No genoma dessa linhagem há o gene *Kan^r*, responsável por conferir resistência ao antibiótico geneticina. Os iniciadores utilizados para amplificação possuem região de homologia ao início e ao final do gene *ROD1* que codifica para a proteína homônima. Os iniciadores estão listados na tabela 2.

Figura 5: Obtenção do módulo de deleção. Os iniciadores foram desenhados para terem regiões de homologia às regiões no início (em azul) no final (em vermelho) do gene *ROD1* ambos possuindo também regiões complementares ao início e ao fim do gene *Kan^r*, respectivamente (setas em verde). O fragmento de DNA oriundo das reações de PCR, o módulo de deleção em questão, tem cerca de 1695pb.



Fonte: Autor.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados

Iniciador	Sequência 5'→3' ^a	Referência
Recombinação		
Rec-ROD1-F	ATGTTTTTCATCATCATCTCGACCTTCAA AAGAGCCATTACCCAGCTGAAGCTTCGT <u>ACGC</u>	Este trabalho
Rec-ROD1-R	CTATGAGCGATCCCGTTTTGTGAACAT CTCCATTAAATTAGCATAGGCCACTAGT <u>GGATC</u>	Este trabalho
Verificação		
Ver-ROD1-F1	AGTCGAGTCCCTTGGTACAT	Este trabalho
Ver-ROD1-F2	CTGCCGTCACCTATGCTCTG	Este trabalho
Ver-ROD1-R	CGAATGATGTCTGTGGGATC	Este trabalho
V-Kanr-F	CCGGTTGCATTTCGATTCC	Bucker (2014)

NOTA: ^a Os iniciadores F (forward) são complementares às fitas 3'→5', os iniciadores R (reverse) são complementares as fitas 5'→3'. Nos iniciadores para Recombinação, as sequências sublinhadas permitem a amplificação dos módulos de deleção, enquanto que as sequências em negrito são para a recombinação homóloga.

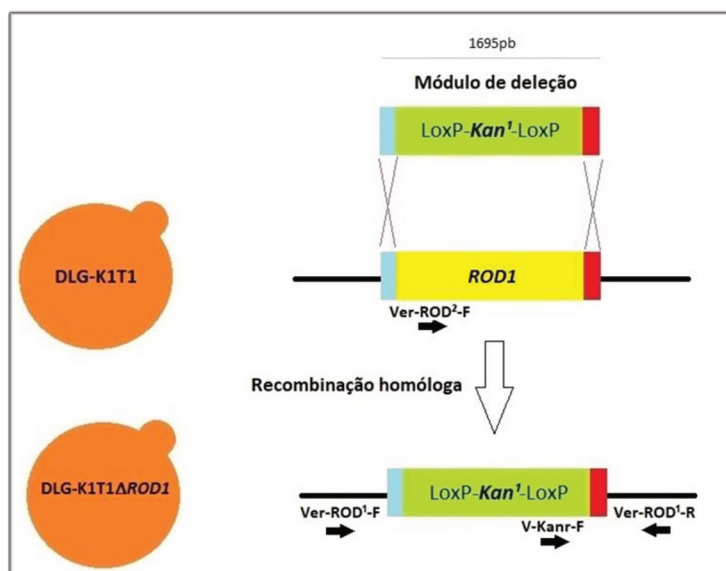
4.3.5 Concentração dos fragmentos de DNA amplificados

Depois de confirmar a obtenção do módulo de deleção gênica com o tamanho esperado (mediante eletroforese em gel de agarose), os produtos provenientes da amplificação por PCR em 24 tubos (25 uL cada) foram concentrados num único Eppendorf por precipitação do DNA, conforme descrito por Dall Agnolo (2014). Para tal, no tubo contendo os módulos de deleção foram adicionados 30 uL de solução 3 M de cloreto de sódio e 750 uL de etanol absoluto gelado (etanol 100% a -20 °C), sendo logo depois estocado em freezer -20 °C por aproximadamente 16 horas. Em seguida, centrifugou-se o tubo (10.000 g, 15 min, 4 °C), com o sobrenadante sendo descartado, e o DNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado (a -20 °C). Após, houve nova centrifugação (10.000g, 7 min, 4 °C), com o sobrenadante descartado, e o tubo mantido numa capela de fluxo laminar por 30 min a fim de secar o etanol remanescente. Finalizando, ressuspendeu-se o DNA precipitado dos 24 tubos de PCR em 50 uL de água deionizada estéril, sendo que a solução contendo o módulo de deleção, por sua vez, foi mantida a -20 °C até sua utilização para transformação das linhagens.

4.3.6 Deleção do gene *ROD1*

O gene *ROD1* foi deletado na linhagem DLG-K1T1 utilizando os fragmentos de DNA, ou módulos de deleção, construídos a partir do genoma da linhagem BSY21-34B3, conforme descrito na seção 4.3.4. A deleção ocorreu mediante processo de recombinação homóloga, sendo o gene *ROD1* substituído pelo módulo de deleção (Figura 6). Posterior à recombinação homóloga, a linhagem recombinante (DLG-K1T1 Δ *rod1*) foi selecionada em placas de Petri contendo meio de cultura com antibiótico geneticina. A transformação foi confirmada através de reações de PCR com os iniciadores Ver-ROD1-F, Ver-ROD2-F, Ver-ROD1-R e V-kanr-F (Tabela 2, seção 4.3.4) conforme a figura 6.

Figura 6: Deleção do gene *ROD1*. O fragmento de DNA chamado módulo de deleção, contendo regiões homólogas ao início do gene *ROD1* (em azul) e ao final dele (em vermelho), substituiu este gene por meio de recombinação homóloga na linhagem DLG-K1T1, dando origem à DLG-K1T1 Δ *rod1*. Os iniciadores utilizados para verificar a deleção foram: Ver-ROD1-F1, Ver-ROD1-R, Ver-ROD-F2 (complementares à região montante, jusante e interna do gene *ROD1*, respectivamente) e V-Kanr-F, complementar à uma região intermediária do gene *Kan^r*.



Fonte: Autor.

4.3.7 Transformação de *S. cerevisiae*

A transformação da levedura foi realizada seguindo metodologia descrita por Gietz e Woods (2006). Primeiramente, as linhagens de interesse foram pré-crescidas em meios YP contendo 20 g/L de maltose, como fonte de carbono, num volume de 3 mL a 28 °C e 160 rpm. Após, 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um frasco Erlenmeyer com capacidade para 250 mL tendo 50 mL de meio YP contendo 20 g/L de maltose. O meio de cultura foi incubado a 28 °C e 160 rpm até alcançar nível de absorbância (ABS600nm) de aproximadamente 1 (fase exponencial de crescimento celular). Posteriormente, centrifugou-se a cultura (3.000 g, 5 min), descartou-se o sobrenadante, e as células por sua vez foram gentilmente ressuspensas em 1 mL de solução 0,1 M de acetato de lítio estéril. Prosseguindo, houve centrifugação das células (3.000, 5 min), tendo o sobrenadante descartado e as células sendo ressuspensas gentilmente em 400 uL de 0,1 M de acetato de lítio estéril. Em seguida, 50 uL dessa suspensão celular foi transferida a um tubo (Eppendorf) e foi adicionado 300 uL de solução PLI (0,1 M de acetato de lítio, 40% polietileno glicol – PEG), somado a 5 uL de DNA de fita simples (10 g/L de DNA de espermatozoides de salmão, previamente incubado em banho maria a 100 °C por 5 min e resfriado

rapidamente em banho de gelo) e 50 uL de DNA do módulo de deleção, ou a mesma quantia de água deionizada como controle negativo. As suspensões celulares foram agitadas gentilmente, sendo incubadas, logo após, em banho maria a 42 °C por 40 min (havendo agitação leve a cada 5 min).

Depois da incubação em banho maria, houve centrifugação dos tubos (3.000 g, 5 min) e o sobrenadante descartado. Continuando, um volume de 1 mL de meio YP contendo 20 g/L de maltose foi adicionado ao tubo a fim de ressuspender as células gentilmente. Os tubos foram incubados a 28 °C por 4h sob agitação orbital de 160 rpm, seguido de centrifugação (3.000 g, 5 min) e descarte do sobrenadante. Ressuspendeu-se, depois, as células utilizando 200 uL de água deionizada estéril, sendo estas inoculadas na superfície de placas de Petri com meio YP contendo 20 g/L de maltose, somado a 200 mg/L de geneticina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C de 3 a 5 dias, até surgirem colônias de células na superfície do meio. Usando as colônias que cresceram, fez-se repique para novas placas contendo o mesmo tipo de meio e condições de cultivo utilizado previamente. Finalmente, as células foram utilizadas para confirmar as modificações no genoma das linhagens através de PCR, iniciadores de verificação (seção 4.3.4) e eletroforese.

4.4 Determinação do crescimento celular

As linhagens de levedura *S. cerevisiae* parental (DLG-K1T1) e a recombinante (DLG-K1T1 Δ *rod1*, tendo o gene *ROD1* deletado) tiveram seus perfis de crescimento analisados, assim como seus respectivos consumos glicose e/ou xilose e produção de metabólitos. Para tal, inicialmente fez-se um pré-cultivo das leveduras por 48 h em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de maltose como fonte de carbono. Posterior a isso, as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas em novos frascos Erlenmeyer com meios sintéticos contendo 2% de glicose e/ou xilose como fontes de carbono e com 1/5 do volume do frasco preenchido com meio de cultura. As incubações foram feitas a 28 °C e 160 rpm. Em tempos pré-determinados, amostras foram retiradas desses meios para determinação do crescimento celular por densidade óptica ABS600nm em espectrofotômetro e, juntamente, outras amostras foram retiradas e centrifugadas, tendo os sobrenadantes armazenados em microtubos a fim de, mais tarde, serem determinados o consumo de açúcares e produção de metabólitos.

4.5 Ensaio fermentativo

Para o ensaio de fermentação em batelada, as leveduras foram cultivadas em 100 mL (num frasco Erlenmeyer com capacidade para 500 mL) de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de maltose como fonte de carbono. Após cerca de 30 horas, as células foram lavadas com água destilada estéril a 4 °C e ressuspensas em água destilada estéril até alcançar uma concentração de 20 g/L. Uma alíquota de 10 mL dessa suspensão celular foi adicionada a 10 mL de meio sintético sem uracila contendo 2% de glicose e/ou xilose como fontes de carbono, porém duas vezes concentrado, em frascos de 20 mL com tampa fechada. Sendo assim, a concentração inicial de células para a fermentação foi de 10 g/L. Houve, então, incubação do frasco sob agitação com barra magnética a 28 °C, conferindo condição microaeróbia. Alternativamente, as fermentações também foram realizadas com baixa densidade celular (ABS600nm de 1,5) e alta concentração de açúcar (5%). Em tempos pré-determinados, amostras foram retirados desses meios para determinação do crescimento celular por densidade óptica ABS600nm em espectrofotômetro e, juntamente, outras amostras foram retiradas e centrifugadas, tendo seus sobrenadantes armazenados em microtubos a fim de, mais tarde, determinar o consumo dos açúcares e produção de metabólitos. Em relação às fermentações em batelada, quando necessário, o valor de absorbância (ABS600nm) medido em espectrofotômetro à 600nm foi convertido em biomassa seca em g/L multiplicando o valor de ABS600nm pelo fator de conversão 0,27 para *S. cerevisiae* (DARIO, 2012).

4.6 Determinação dos substratos e produtos dos crescimentos e fermentações

Utilizando as amostras retiradas durante os cultivos, foram realizadas as dosagens de glicose, xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), nas seguintes condições: coluna de ácido orgânico HyperREZ XP (Thermo Scientific), fase móvel com ácido sulfúrico 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min durante 30 min, temperatura da coluna de 50 °C e detecção por índice de refração (IR-2031 plus, Jasco). As curvas de calibração foram estabelecidas empregando quatro concentrações diferentes de glicose, xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Modificações genômicas em linhagem de *S. cerevisiae*

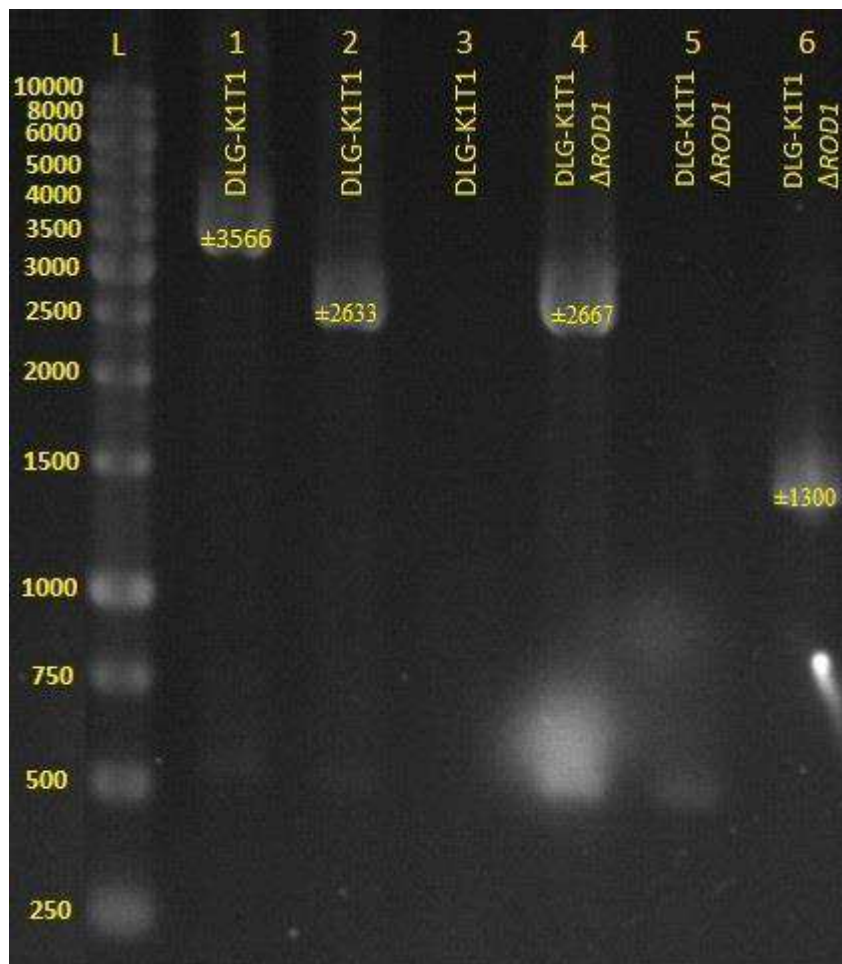
Como mencionado na introdução do presente trabalho, apesar das expectativas promissoras, o desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar a xilose de modo industrialmente viável ainda possui problemas a serem solucionados. Dentre eles, pode-se citar a necessidade de aperfeiçoar a captação da pentose, assim como a busca para aumentar a eficiência de sua rota metabólica intracelular (MOYSÉS *et al.*, 2016). Entretanto, outra abordagem que visa melhorar a capacidade fermentativa com a xilose é a prevenção da degradação do transportador responsável pela captação desse açúcar. Essa degradação é realizada mediante processo de ubiquitinação seguido de endocitose do transportador (HORÁK, 2004). No caso do transportador *HXT1*, artigos têm mostrado que a α -arrestina *ROD1* parece ser a necessária para recrutar o complexo proteico responsável pela ubiquitinação do transportador, o *RSP5*. Como a inibição da ubiquitinação do *HXT1* acarreta na permanência do transportador na membrana, impedindo sua degradação (ROY *et al.*, 2014), supõe-se que a deleção do gene *ROD1* possa contribuir para um maior consumo e fermentação da xilose. Neste trabalho, desenvolveu-se uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* deletando o gene *ROD1* na linhagem de laboratório DLG-K1T1, a qual possui sobre-expressão dos genes responsáveis para a metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*), e com os principais genes que codificam os transportadores de hexoses deletados (*hxt*-null), com a exceção do gene *HXT1* que é sobre-expresso através de um plasmídeo de expressão.

Para isso, foram construídos fragmentos de DNA, chamados Módulos de Deleção, amplificando-os através de técnica de PCR a partir da linhagem de laboratório de *S. cerevisiae* BSY21-34B3 (detalhado em Material e Métodos). Os módulos de deleção provenientes dessas reações de PCR apresentavam em torno de 1.695 pares de bases de comprimento, tendo em seu centro o gene *Kan^R*, sendo que em suas extremidades há sequências homólogas às regiões cromossômicas correspondentes aos 40 primeiros nucleotídeos anteriores ao códon de iniciação, e 40 nucleotídeos correspondentes à região após códon de terminação do gene *ROD1*. Posteriormente à recombinação homóloga empregando a linhagem DLG-K1T1 e o Módulo de Deleção, originou-se a linhagem DLG-K1T1 Δ *rod1*. O êxito na deleção desejada pode ser confirmado através de análise em gel de agarose de novas reações de PCR utilizando o DNA extraído da linhagem recombinante

DLG-K1T1 $\Delta rod1$ e iniciadores construídos especificamente para a verificação (vide seção 4.3.4, Tabela 2).

Analisando a Figura 7, nota-se que o produto de reações de PCR empregando o DNA da linhagem DLG-K1T1 e os iniciadores Ver-ROD1-F1 e Ver-ROD1-R, que ligam-se à montante e à jusante do gene *ROD1*, foi um fragmento de aproximadamente 3.566 pares de base (linha 1), mostrando a presença deste gene no genoma daquela linhagem. Para corroborar tal afirmação, a linha 2 corresponde ao produto de PCR da mesma linhagem, mas com iniciadores Ver-ROD1-F2 e Ver-ROD1-R, que ligam internamente e à jusante do gene *ROD1*, respectivamente, produzindo um fragmento de aproximadamente 2633 pares de base. A linha 3 corresponde à PCR da linhagem DLG-K1T1 com iniciadores V-Kanr-F e Ver-ROD1-R, não apresentando produto de amplificação pelo fato desse primeiro iniciador se ligar internamente ao gene *Kan^R* presente no módulo de deleção (módulo ausente nessa linhagem). Por sua vez, as linhas 4, 5 e 6 são referentes às reações de PCR empregando a linhagem DLG-K1T1 $\Delta rod1$ e usando pares de iniciadores iguais aos das linhas 1, 2 e 3, respectivamente. Assim sendo, a linha 4 apresenta como produto de reação fragmentos de aproximadamente 2.667 pares de base, confirmando a deleção do gene *ROD1* usando o módulo de deleção construído, cujo tamanho é 1695 pares de base. Corroborando tal afirmação a linha 5, correspondente à reação com iniciadores Ver-ROD1-F2 e Ver-ROD1-R, não apresenta produto de PCR, pois o iniciador Ver-ROD1-F2 se liga à região interna do gene *ROD1*, que não está mais presente na linhagem recombinante desenvolvida. Por último, a linha 6 é referente à reação que utilizou os iniciadores V-Kanr-F e Ver-ROD1-R (ligantes na região intermediária do gene *Kan^r* e região à jusante do gene *ROD1*, respectivamente) e apresenta como produto fragmentos de aproximadamente 1.300 pares de base, logo, confirmando a presença do módulo de deleção no lugar do gene *ROD1*.

Figura 7: Confirmação da deleção do gene *ROD1* na linhagem DLG-K1T1. O módulo de deleção foi inserido através de recombinação homóloga na linhagem DLG-K1T1, originando a linhagem DLG-K1T1 Δ *rod1*. Na imagem: linha L representa o marcador molecular GeneRuler (1 kb); linha 1 (iniciadores Ver-ROD1-F1 e Ver-ROD1-R), linha 2 (iniciadores Ver-ROD1-F2 e Ver-ROD1-R) e linha 3 (iniciadores V-Kanr-F e Ver-ROD1-R) empregando a linhagem DLG-K1T1; linha 4 (iniciadores Ver-ROD1-F e Ver-ROD1-R), linha 5 (iniciadores Ver-ROD1-F2 e Ver-ROD1-R) e linha 6 (iniciadores V-Kanr-F e Ver-ROD1-R) empregando a linhagem DLG-K1T1 Δ *rod1*.

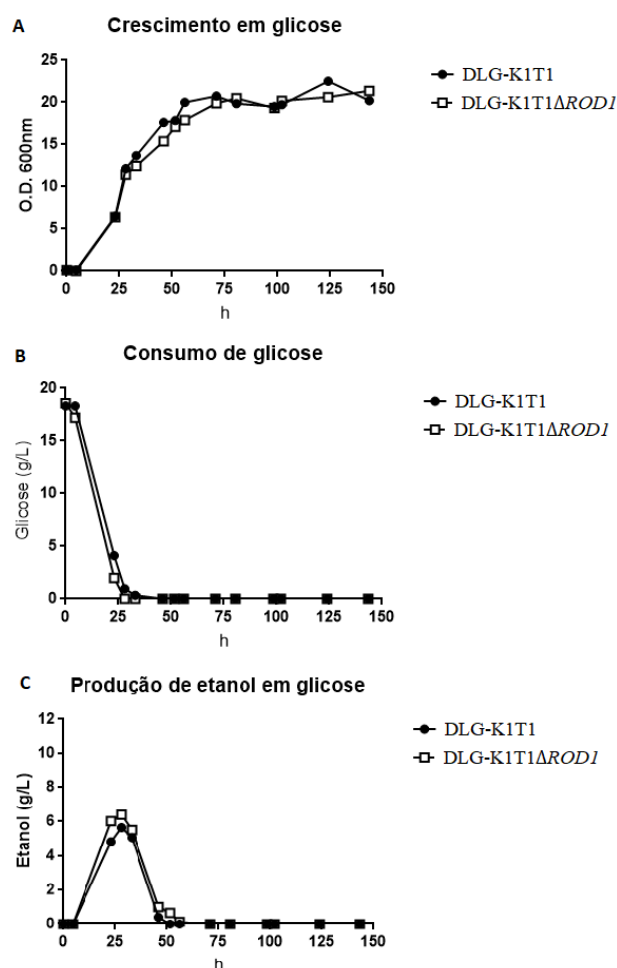


5.2 Análise do crescimento das linhagens em glicose e/ou xilose

Após confirmação da deleção do gene *ROD1*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar os perfis de crescimento das linhagens de levedura DLG-K1T1 Δ *rod1* e DLG-K1T1 nas fontes de carbono glicose e/ou xilose. A Figura 8 mostra a performance metabólica das duas linhagens durante o crescimento celular em glicose. No primeiro gráfico (A), é possível visualizar um padrão de crescimento em glicose muito semelhante por parte de ambas as linhagens, com suas fases logarítmicas de crescimento se estendendo até aproximadamente 50 h de cultivo. No segundo gráfico (B), é mostrado o perfil de consumo de glicose das duas linhagens, cujos resultados foram muito parecidos,

havendo esgotamento da glicose do meio em aproximadamente 25 h de crescimento. Por último, o gráfico C mostra a produção de etanol a partir de glicose das linhagens parental e recombinante. Nele, é possível verificar perfis de produção de etanol muito semelhantes também, sendo que a produção total por cada linhagem atingiu por volta de 6,0 g/L. Desta forma, nota-se que a deleção do gene *ROD1* não influenciou no perfil de crescimento, consumo da glicose e produção de etanol da linhagem recombinante DLGK1T1 Δ *rod1*. Esse resultado já era esperado, pois as células estavam crescendo em meio contendo exclusivamente glicose como fonte de carbono, cuja presença previne a endocitose do transportador *HXT1* (ROY *et al.*, 2014).

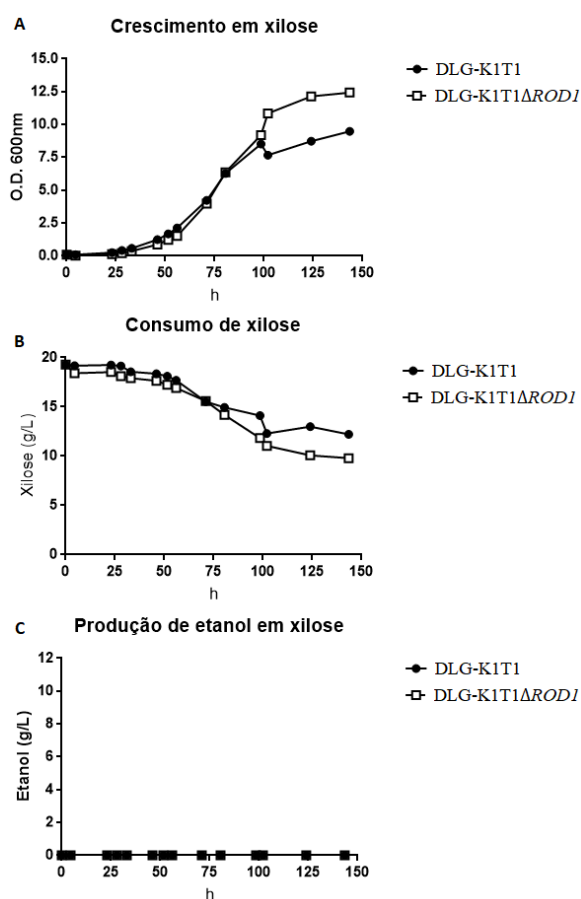
Figura 8: Crescimentos aeróbicos das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ *rod1* em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose como fonte de carbono. Os gráficos apresentam, respectivamente, crescimento celular (A), consumo de glicose (B) e produção de etanol (C) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os gráficos representam a média de dois crescimentos independentes.



Na Figura 9, está representada a performance metabólica das duas linhagens em meio contendo como fonte única de carbono a xilose. No primeiro gráfico (A), pode-se

verificar que os perfis de crescimento em xilose são praticamente o mesmo para as duas linhagens nas primeiras 75-100 h de incubação. Entretanto, a partir de 100 h de cultivo, a linhagem DLG-K1T1 $\Delta rod1$ cresceu e consumiu mais a xilose (gráfico B), do que a linhagem parental DLG-K1T1. Para ambas as linhagens não foi detectada a produção de etanol no meio de cultivo. É possível que, durante o crescimento em condições aeróbicas contendo apenas xilose como fonte de carbono, as leveduras empregaram a pentose na respiração aeróbica ao invés de fermentação alcoólica, explicando a ausência de etanol produzido. Isso é condizente com pesquisas que demonstraram que, quando açúcares são consumidos lentamente, o metabolismo das leveduras é essencialmente respiratório (DUVAL *et al.*, 2010).

Figura 9: Crescimentos aeróbicos das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 $\Delta rod1$ em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono. Os gráficos apresentam, respectivamente, crescimento celular (A), consumo de glicose (B) e produção de etanol (C) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os gráficos representam a média de dois crescimentos independentes.



De fato, os dados da Tabela 3 mostram que a linhagem a DLG-K1T1 consumiu cerca de 37% de xilose, apresentando uma velocidade de consumo de 0,065 g/L.h, ao passo

que a linhagem DLG-K1T1 Δ *rod1* consumiu aproximadamente 49% de xilose, com velocidade de 0,110 g/L.h. Esse maior crescimento, por sua vez, pode ser devido à linhagem deletada no gene *ROD1* ter possivelmente maior estabilidade do transportador *HXT1* na membrana e, como consequência, ter consumido mais xilose do que a linhagem parental.

Tabela 3: Consumo e velocidade de consumo de xilose durante o crescimento em 20 g/L de xilose das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ *rod1*.

LEVEDURA:	Consumo de xilose (%)	Velocidade de consumo de xilose (g/L.h)
DLG-K1T1	37,4 \pm 2,7	0,065 \pm 0,005
DLG-K1T1 Δ <i>rod1</i>	49,2 \pm 5,2	0,110 \pm 0,015

Na figura 10 está representada a performance fermentativa das linhagens durante o crescimento utilizando como fonte de carbono 20 g/L de glicose acrescida de 20 g/L de xilose. O gráfico A aborda o perfil de crescimento, sendo possível visualizar que a linhagem parental cresceu mais se comparada com a recombinante deletada no *ROD1*. O consumo de glicose pelas duas linhagens apresentou perfis muito semelhantes (gráfico B). Os resultados são também semelhantes aos vistos no consumo de glicose quando esta hexose era a única fonte de carbono (Figura 8-B). O gráfico C da Figura 10 evidencia o consumo de xilose em meio contendo glicose e xilose. Diferente do resultado do consumo de xilose como fonte única de carbono, o perfil de consumo desta pentose foi consideravelmente mais rápido por ambas as linhagens e, além disso, o total de xilose consumida do meio foi significativamente maior também, aproximando-se de 84% do total com a linhagem DLG-K1T1 Δ *rod1* (Tabela 4). Um maior consumo de xilose na presença de glicose pela linhagem DLG-K1T1 vai ao encontro dos resultados obtidos por Gonçalves e colaboradores (2014), cujo estudo relatou também um consumo maior de xilose na presença de glicose. Isso pode estar acontecendo devido ao fato da presença da glicose prevenir a internalização do transportador *HXT1* induzida pela ausência dessa hexose (ROY *et al.*, 2014), já que a linhagem DLG-K1T1 Δ *rod1* consumiu mais xilose e o fez mais rapidamente (Tabela 4). É interessante notar que o consumo de xilose foi mais intenso para a linhagem recombinante deletada no gene *ROD1*, em comparação com a parental, somente durante as primeiras 25 horas de incubação – tempo, este, em que houve o consumo total da glicose presente no meio (Figura 10-B). Na Figura 10-D é possível verificar que a produção total de etanol de ambas as linhagens foi muito semelhante, mas o consumo de xilose contribuiu para a

produção dos ~10 g/L de etanol, enquanto que com apenas 20 g/L de glicose a produção máxima de etanol foi de aproximadamente ~6 g/L (Figura 9-C). Dadas as condições aeróbicas do crescimento, as células de ambas as linhagens começaram a consumir o etanol produzido durante a fermentação logo após a exaustão da glicose (Figuras 9-C e 10-D), e a linhagem DLG-K1T1 Δ rod1 claramente demorou para utilizar o etanol como fonte de carbono por que ainda estava consumindo xilose (Figura 10-C).

Figura 10: Crescimentos aeróbicos das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ rod1 em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose e 2% xilose como fontes de carbono. Os gráficos apresentam, respectivamente, crescimento celular (A), consumo de glicose (B), consumo de xilose (C) e produção de etanol (D) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os gráficos representam a média de dois crescimentos independentes.

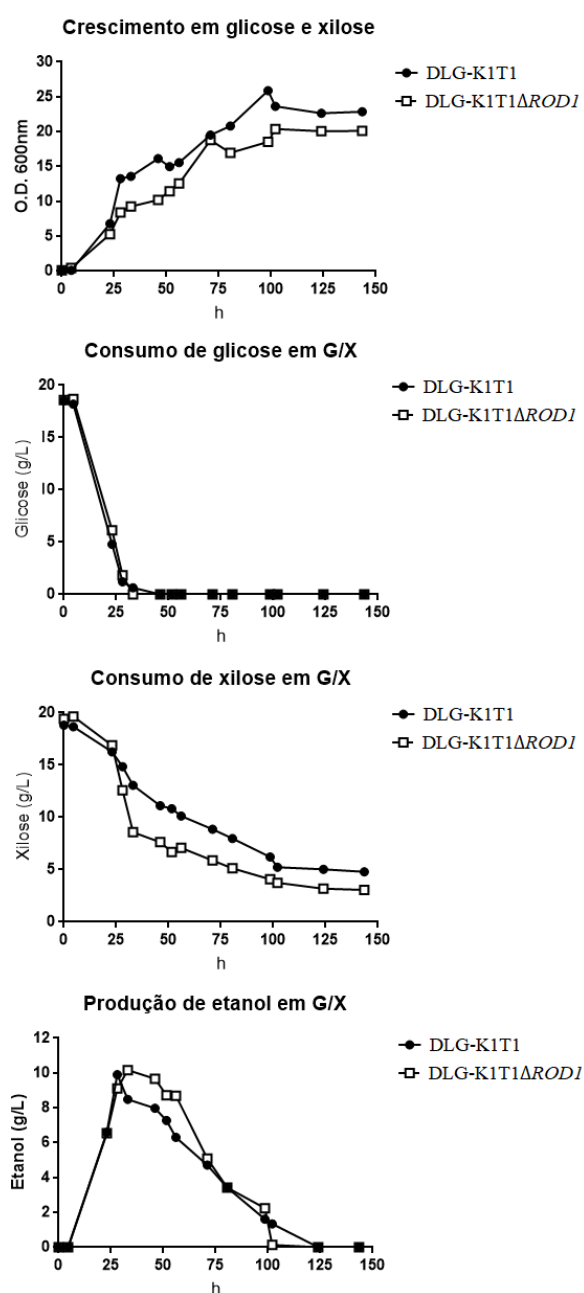


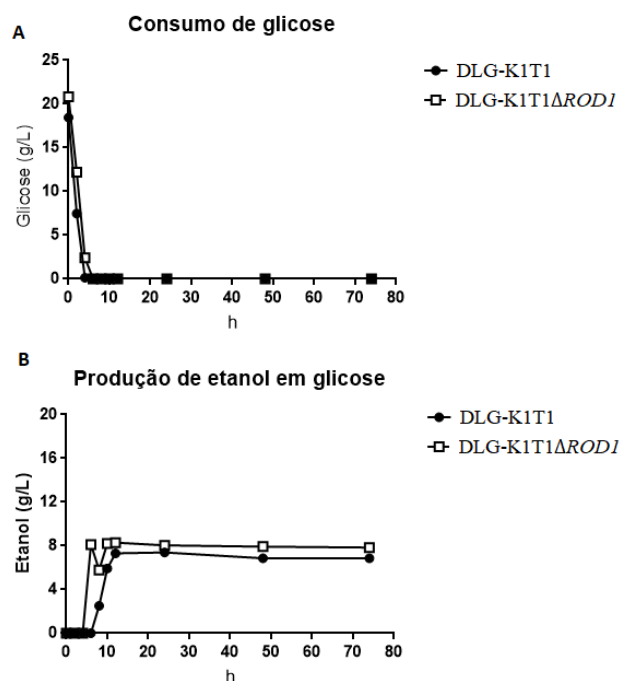
Tabela 4: Consumo e velocidade de consumo de xilose durante o crescimento em 20 g/L de glicose e xilose das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ rod1.

LEVEDURA:	Consumo de xilose (%)	Velocidade de consumo de xilose (g/L.h)
DLG-K1T1	74,5 \pm 0,9	0,144 \pm 0,053
DLG-K1T1 Δ rod1	84,3 \pm 1,4	0,316 \pm 0,017

5.3 Análise da performance fermentativa em batelada com elevada concentração celular

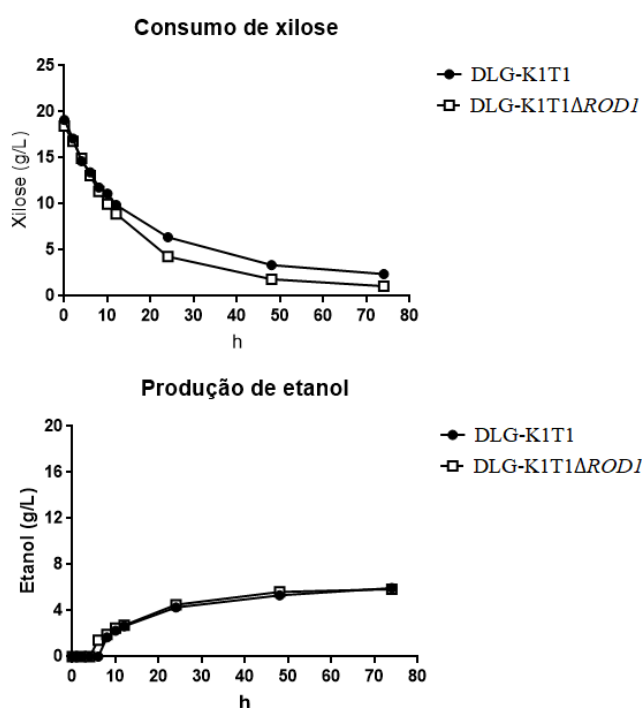
A Figura 11 mostra o consumo de 20 g/L de glicose (gráfico A) e a produção de etanol a partir de glicose (gráfico B) durante uma fermentação em batelada em condições microaeróbicas com altas densidades celulares (10 g/L). Ambas as linhagens consumiram rapidamente a glicose, havendo total consumo do carboidrato em até 5 horas de fermentação, produzindo ambas as linhagens a mesma quantidade de etanol (~8 g/L).

Figura 11: Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ rod1. Os gráficos apresentam o consumo de glicose (A) e produção de etanol (B) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos.



Por sua vez, os resultados da fermentação em batelada utilizando 20 g/L de xilose como fonte de carbono podem ser visualizados na Figura 12. No gráfico A, é possível visualizar que os perfis de consumo de xilose de ambas as linhagens foram parecidos, havendo um consumo de xilose ligeiramente maior por parte da linhagem deletada no *ROD1*. Além disso, cerca de 90% do total da pentose do meio foi consumido em até 75 h de cultivo por ambas as linhagens. O gráfico B mostra o perfil de produção de etanol a partir de xilose, onde pode-se verificar que a produção total do metabólito das duas linhagens foi semelhante e alcançou aproximadamente 7 g/L.

Figura 12: Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono realizada pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ *rod1*. Os gráficos apresentam o consumo de xilose (A) e produção de etanol (B) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos.

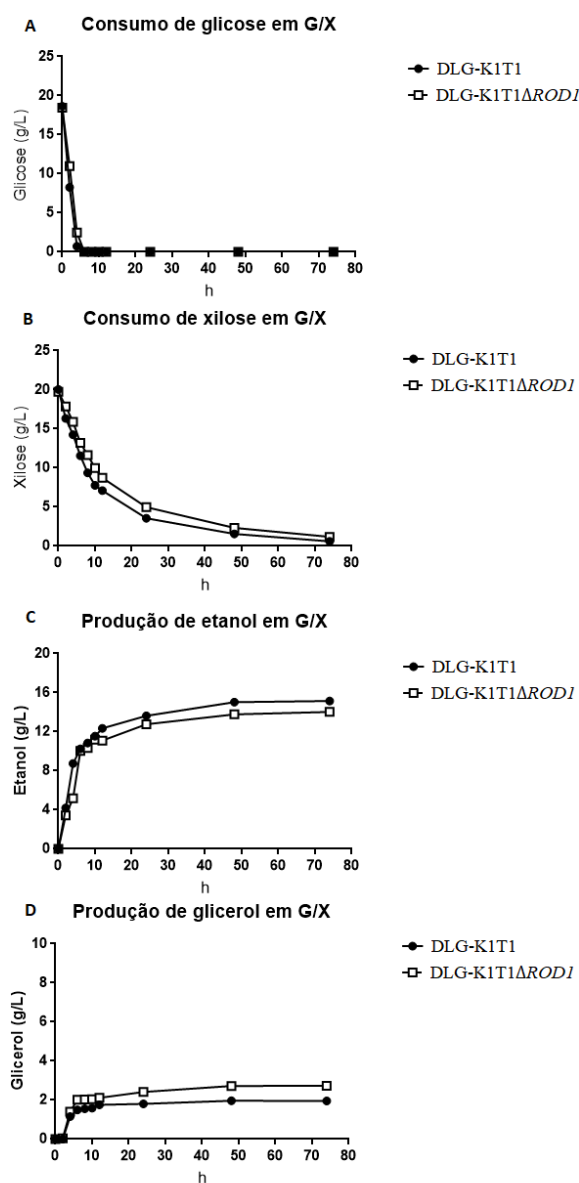


Ao contrário do esperado, a deleção do gene *ROD1* pareceu não resultar num aumento do consumo da xilose na linhagem recombinante nesta condição de fermentação com alta densidade celular. Um estudo realizado por Sen e colaboradores (2016) apontou que, apesar da deleção de quatro arrestinas responsáveis pela endocitose de um transportador de celobiose (*CDT-1*) ter diminuído consideravelmente a internalização dele, o consumo da celobiose e consequente produção de *etanol* não foi diferente dos realizados pela linhagem parental, em fermentações com alta densidade de células. Sen e colaboradores (2016), então, sugerem que a alta capacidade de captação de celobiose do

transportador *CDT-1* e a alta concentração celular tornaram irrisório o possível aumento da concentração de transportadores na membrana plasmática ocasionada pela deleção das arrestinas. Seguindo o raciocínio, pode-se sugerir que, em nossos resultados, a xilose foi consumida de maneira semelhante pelas duas linhagens neste experimento porque, apesar de talvez os transportadores *HXT1* estarem sendo submetidos à endocitose induzida pela ausência de glicose na linhagem parental e serem mais estáveis na linhagem recombinante, em alta concentração celular a quantidade de transportadores na membrana não seja um fator muito limitante para a metabolização da xilose nessa levedura. Como a fermentação em batelada tem como característica uma concentração celular muito alta (10 g/L), supõe-se que tenha havido um efeito acumulativo dos poucos transportadores remanescentes na membrana de cada célula, possibilitando que a xilose fosse amplamente consumida e tornando a produção de etanol por ambas as linhagens (parental e recombinante) muito semelhante.

A Figura 13 apresenta os resultados da co-fermentação em batelada de 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ *rod1*. O gráfico A mostra que os consumo de glicose por ambas as linhagens apresentaram perfis muito semelhantes, com o total da hexose tendo sido consumida em até 5 h de cultivo, resultado semelhante ao observado para o consumo desta hexose em fermentação em batelada usando como fonte única de carbono a glicose (Figura 11-A). Enquanto isso, no gráfico B é possível verificar que os consumos de xilose pelas duas linhagens foram muito parecidos, havendo praticamente o consumo total da pentose, como ocorreu quando apenas xilose era a fonte de carbono (Figura 12), e ambas as linhagens produziram praticamente a mesma quantidade de etanol (Figura 13-C), claramente a partir dos dois açúcares. Nota-se que ambas as linhagens produziram por volta de 2 g/L de glicerol (Figura 13-D). A produção de glicerol nas co-fermentações pode estar relacionada ao estresse osmótico causado pela alta concentração de açúcar (40 g/L) ao qual as leveduras estavam submetidas (HOHMANN *et al.*, 2002). É possível visualizar que não houve uma diferença substancial no consumo de xilose pelas duas linhagens, reforçando a suposição de que a alta concentração celular torne irrisória a diferença de estabilidade dos transportadores nas duas linhagens, sugerindo que a atividade de transporte não seja um fator limitante em fermentação em batelada com altas densidades celulares.

Figura 13: Co-fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose e 2% xilose como fonte de carbono realizada pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ rod1. Os gráficos apresentam o consumo de glicose (A) ou xilose (B), bem como a produção de etanol (C) e glicerol (D) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos.

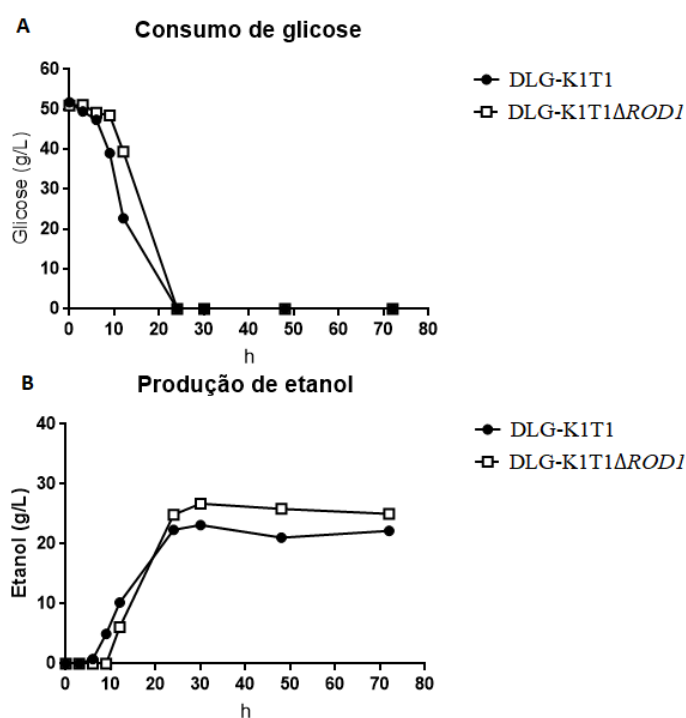


5.4. Análise da performance fermentativa em batelada com elevada concentração de açúcar

Considerando os resultados obtidos nas fermentações em batelada com altas concentrações de células e 2% das fontes de carbono, foram também realizadas fermentações com uma concentração maior do açúcar (5%) e menor concentração celular (D.O._{600nm} inicial igual a 1,5, correspondendo a ~0,5 g/L de células), como descrito por Gonçalves e colaboradores (2014).

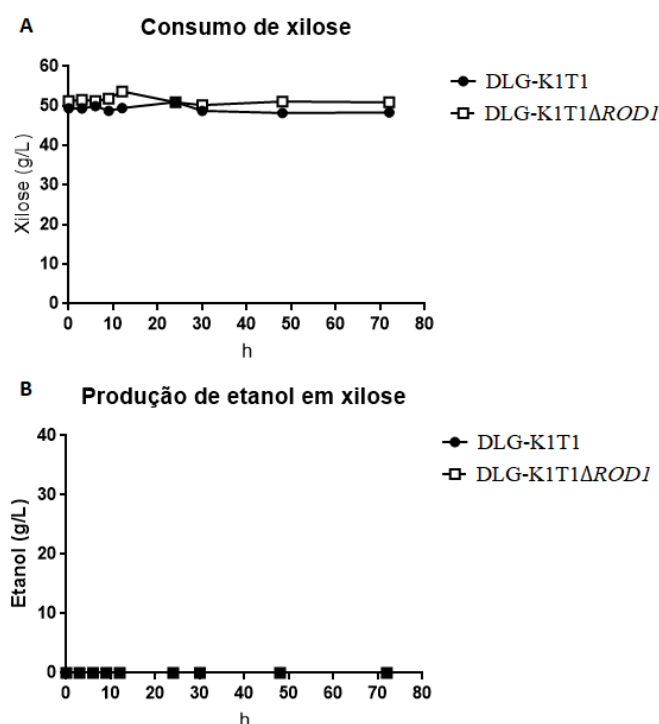
A Figura 14 mostra o consumo de 5% glicose durante a fermentação em batelada com baixa concentração celular, sendo que ambas as linhagens consumiram totalmente o carboidrato em até 25h de cultivo (Figura 14-A), levando à produção máxima de etanol (Figura 14-B), condizente com os resultados já publicados para a linhagem DLG-K1T1 (GONÇALVES *et al.*, 2014). Nota-se que o consumo de glicose e a produção de etanol foram muito semelhantes entre as linhagens, e de fato, em meio contendo glicose não é esperado que haja diferença na captação de glicose devido ao fato da internalização do transportador *HXT1* ser promovida pela ausência dessa hexose (ROY *et al.*, 2014).

Figura 14: Fermentação em batelada com baixa concentração celular de meios sintéticos sem uracila contendo 5% de glicose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ *rod1*. Os gráficos apresentam o consumo de glicose (A) e produção de etanol (B) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos.



Os resultados da fermentação de 5% xilose com baixa concentração de células estão apresentados na Figura 15. Como pode ser observado nesta figura, não houve consumo de xilose por parte de nenhuma das duas linhagens, e portanto não foi produzido etanol pelas linhagens, resultado condizente com aqueles reportados por Gonçalves e colaboradores (2014) com a linhagem DLG-K1T1, e que indicam que a α -arrestina *ROD1* não estaria envolvida na remoção do *HXT1* da membrana quando altas concentrações de xilose estão presentes no meio já que a linhagem deletada na α -arrestina *ROD1* continua incapaz de consumir 5% de xilose.

Figura 15: Fermentação em batelada com baixa concentração celular de meios sintéticos sem uracila contendo 5% de xilose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ rod1. Os gráficos apresentam o consumo de xilose (A) e produção de etanol (B) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos.



O'Donnel e colaboradores (2014) demonstraram que a proteína *ROD1*, das nove α -arrestinas conhecidas em *S. cerevisiae*, é a única responsável pela internalização do transportador *HXT1* quando as células foram crescidas em meios contendo glicose acrescidos de 0,2% de 2-deoxi-glicose. Este último, um análogo de glicose, é conhecido por inibir o consumo de glicose já que não é metabolizável na via glicolítica após a 2-deoxi-glicose-6-fosfato (PELICANO *et al.*, 2006). Nessa condição, com glicose extracelular mas sem consumo de glicose intracelularmente, parece que a α -arrestina *ROD1* é responsável pela ubiquitinação e endocitose do transportador *HXT1* quando o consumo de glicose não está acontecendo (mesmo na presença de glicose). Nossos resultados, por outro lado, demonstram que, quando não há glicose extracelularmente nos meios fermentativos com alta concentração de xilose e baixa concentração de células, a deleção do gene *ROD1* não melhorou a fermentação da xilose. Sendo assim, supõe-se que essa proteína não seja a única α -arrestina responsável por recrutar a proteína *RSP5*, que tem como função ubiquitinar o transportador *HXT1*, desencadeando sua internalização.

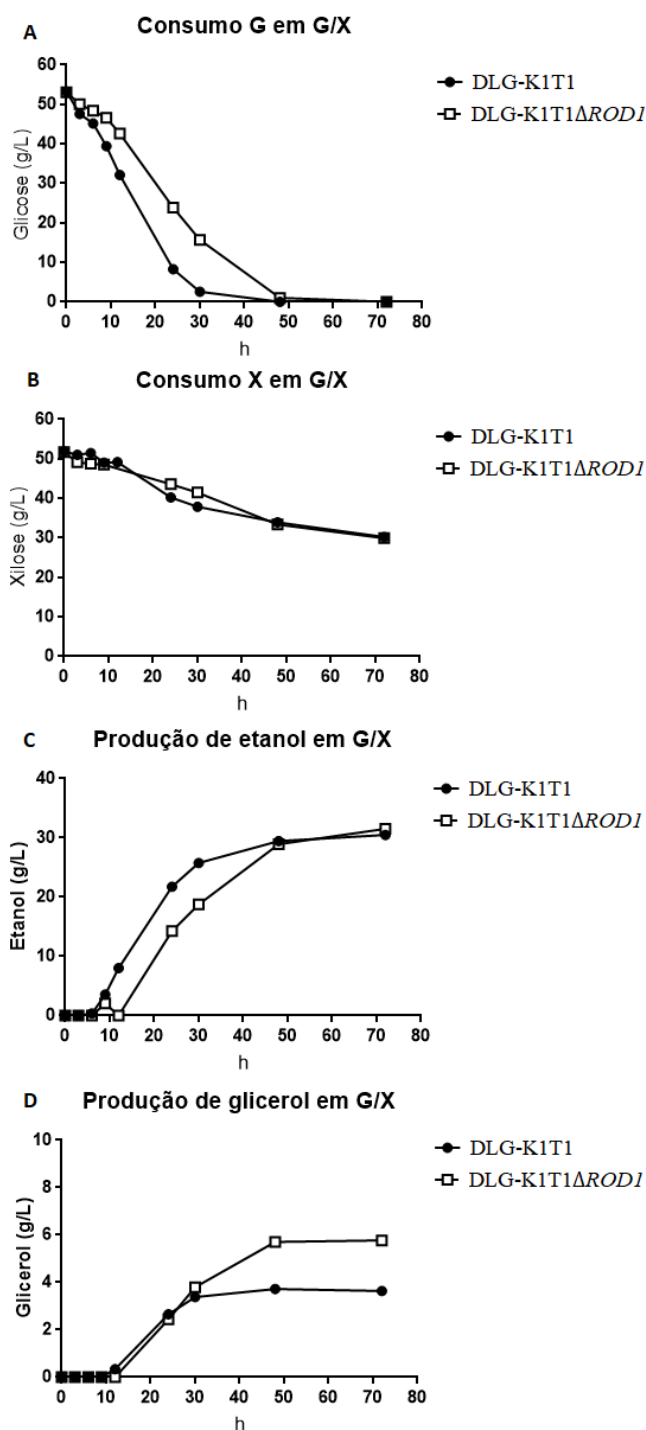
É relatado que diferentes α -arrestinas são responsáveis por intermediar a ubiquitinação e endocitose dos mesmos transportadores (NIKKO *et al.*, 2008, NIKKO &

PELHAM, 2009). Atrélado a isso, é importante destacar que o estudo realizado por Roy e colaboradores (2014) demonstrou que resíduos de lisina, nas posições 12 e 39 da porção N-terminal do transportador *HXT1*, são possíveis alvos de ubiquitinação, acarretando na endocitose desse transportador. Logo, é possível que diferentes arrestinas sejam capazes de recrutar a proteína *RSP5* até diferentes resíduos de lisina, explicando por que a ausência da arrestina *ROD1* não tenha apresentado melhoras na captação de xilose. Além disso, Sen e colaboradores (2016) apontaram que a deleção conjunta de quatro arrestinas diminuiu de maneira acumulativa a internalização de transportadores heterólogos de celobiose, aumentando o consumo deste carboidrato e consequentemente aumentando também a produção de etanol. Portanto, apesar do estudo de O'Donnel e colaboradores (2014) evidenciar que a *ROD1* é a principal α -arrestina conhecida responsável pela internalização do transportador *HXT1* em meio com 2-deoxi-glicose, é possível que outra α -arrestina, ainda não identificada, seja responsável pelo recrutamento da proteína *RSP5* na presença de altas concentrações de xilose no meio extracelular e/ou na ausência de glicose. Por outro lado, é reportado que em meios contendo alta concentração de xilose, o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para consumirem xilose era inibido, sugerindo que concentrações muito altas de xilose podem ser também tóxicas às células (VAN FLEET, JEFFRIES & OLSON, 2008).

Os resultados da co-fermentação de 5% glicose e 5% xilose em baixa concentração celular, realizada pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 $\Delta rod1$, são mostrados na Figura 16. No gráfico A, é possível notar que a presença de 5% xilose prejudica o consumo de 5% glicose, uma vez que a linhagem DLG-K1T1 passou a consumir a glicose do meio mais lentamente, sendo que o açúcar foi totalmente consumido em 30 horas de cultivo, como já descrito (GONÇALVES *et al.*, 2014) e consequência da competição entre os dois açúcares pelo transportador *HXT1*. Curiosamente, o consumo de glicose foi ainda mais prejudicado pela presença de xilose na linhagem DLG-K1T1 $\Delta rod1$, que só exauriu a hexose do meio em aproximadamente 50 horas. O gráfico B mostra o consumo de 5% xilose, evidenciando que ambas as linhagens consumiram o açúcar de forma semelhante, com cerca de 35% da xilose do meio consumida até aproximadamente 75 horas de incubação. Sendo assim, esses dados indicam que a deleção do gene *ROD1* não melhorou o consumo de xilose durante a co-fermentação de altas concentrações de xilose e glicose. Condizente com o mais lento consumo de glicose pela linhagem DLG-K1T1 $\Delta rod1$, a produção de etanol a partir da co-fermentação de 5% glicose e 5% xilose foi mais lenta na linhagem deletada no *ROD1*,

embora ambas as linhagens apresentaram produção total de etanol próxima a 30 g/L em até 75 h de cultivo (Figura 16-C). Por último, o gráfico D apresenta a produção de glicerol, que na linhagem deletada na *ROD1* é quase o dobro do que o produzido pela parental.

Figura 16: Co-fermentação em batelada com baixa concentração celular de meios sintéticos sem uracila contendo 5% de glicose e 5% xilose como fonte de carbono realizada pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 Δ rod1. Os gráficos apresentam o consumo de glicose (A) ou xilose (B), bem como a produção de etanol (C) e glicerol (D) pelas linhagens indicadas, determinados como descrito em Materiais e Métodos.



5. CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos nesse trabalho, é possível concluir que:

- A deleção do gene *ROD1* permitiu uma melhoria no consumo de xilose durante o crescimento em 2% xilose, ou misturas de 2% xilose e 2% glicose, pela linhagem contendo apenas o transportador *HXT1*. Sugere-se, então, que houve uma maior estabilidade dos transportadores *HXT1* nas membranas plasmáticas das células recombinantes provocado pela ausência da α -arrestina *ROD1*.
- Não foi possível observar diferenças significativas no consumo e fermentação dos açúcares durante fermentações em batelada com altas densidades celulares e 2% dos açúcares pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 $\Delta rod1$, indicando que nestas condições a quantidade de transportador *HXT1* na membrana não seja um fator limitante para o eficiente consumo dos açúcares, independentemente da presença ou não da α -arrestina *ROD1*.
- Finalmente, os resultados de consumo de 5% xilose em baixas concentrações celulares demonstraram não haver consumo por nenhuma das duas linhagens, embora durante as co-fermentações de 5% glicose mais 5% xilose a pentose tenha sido parcialmente consumida. No entanto, não foi observada diferenças no consumo de xilose pelas linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T1 $\Delta rod1$, indicando que possivelmente haja outra α -arrestina responsável por mediar a endocitose do transportador *HXT1* na ausência de glicose (e presença de xilose).

PERSPECTIVAS

- Analisar a quantidade e localização celular do transportador *HXT1*, mediante microscopia confocal e Western Blotting, para obter maiores dados sobre a influência da α -arrestina *ROD1* na ubiquitinação e endocitose daquele transportador na presença de xilose.
- Repetir a análise de perfil de crescimento e performance fermentativa deletando, separadamente ou em pares, outros genes codificadores para α -arrestinas endógenas de *S. cerevisiae* na linhagem DLG-K1T1, no intuito de identificar outras α -arrestinas responsáveis pela endocitose do transportador *HXT1*, especificamente na presença de xilose e/ou na ausência de glicose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARO, C.G.; O'DONNELL, A.F.; PROSSER, D.C.; AUGUSTINE, A.A.; GOLDMAN, A.; BRODSKY, J.L.; CYERT, M.S.; WENDLAND, B.; THORNER, J. Specific Alpha-Arrestins Negatively Regulate *Saccharomyces cerevisiae* Pheromone Response by Down-Modulating the G-Protein-Coupled Receptor Ste2. **Molecular And Cellular Biology**, v. 34, n. 14, pg. 2660-2681, 2014.

BERMANN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. **Revista Ciência e Cultura (SBPC)**. v. 60, n.3, 2008.

BERNDES, G.; AHLGREN, S.; BÖRJESSON, P.; COWIE, A.L. Bioenergy and Land use change - state of the art. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment**. v.2, n.3, p. 251-362, 2013.

BERTILSSON, M.; ANDERSSON, J.; LIDÉN, G. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 31, n.4, p. 369-377, 2008.

BETA RENEWABLES. Disponível em: <http://betarenewables.com/>, acesso em setembro de 2017.

BISSON, L. F.; COONS, D.M.; KRUCKEBERG, A.L.; LEWIS, D.A. Yeast sugar transporters. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 28, p. 259-308, 1993.

BOLES, E. & HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 21, n.1, pg. 85-111, 1997.

BRAUN, S.; APPEL, L.G.; SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Revista Química Nova**. v. 27, n. 23, pg. 472-482, 2003.

BÜCKER, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.

CARVALHO, J. F. Combustíveis fósseis e insustentabilidade. **Revista Ciência e Cultura**. v. 60, 2008.

CHU, B.C.H. & H. LEE. 2007. Genetic Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Fermentation. **Biotechnology Advances**, vol.25, n.5, pg; 425–441.

CONANT, G. C & WOLFE, K. H. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. **Molecular Systems Biology**. v.3, pg. 129, 2007.

DALL AGNOLO, D. **Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2014.

DARIO, M.G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2012.

DIDERICH, J.A.; SCHEPPER, M.; van HOEK, P.; LUTTIK, M.A.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, H.F.; van DAM, K. KRUCKEBERG, A.L. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Sacchchromyces cerevisiae*. **The Journal of Biological and Chemistry**. v. 274, n.22, pg.15350-15359, 1999.

DOS SANTOS, Danielle da Silveira. Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012.

DUVAL, E.H.; ALVES Jr., S.L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B.U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy

number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**. v.109, p.289-259, 2010.

ELBING, K.; LARSSON, C.; BILL, R.M.; ALBERS, E.; SNOEP, J.L; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.9, pg. 5323-5330, 2004.

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. **Revista Conexão Eletrônica**. v. 12, 2015.

FAPESP. **Brasil Líder Mundial em Conhecimento e Tecnologia de Cana e Etanol – A Contribuição da FAPESP**. cap. 5, 2007.

GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Methods in Molecular Biology**. v. 313, p. 107–120, 2006.

GOFFEAU, A.; BARREL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**. v. 274, n.5287, pg. 546-567, 1996.

GONÇALVES, D. L., A. MATSUSHIKA, B. B. de SALES, T. GOSHIMA, E. P. S. BON & B. U. STAMBUK. 2014. Xylose and Xylose/glucose Co-Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Expressing Individual Hexose Transporters. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 63, pg. 13–20, 2014.

GRANBIO. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/>, acesso em dezembro de 2017.

GUARIEIRO, L.L.N.; VASCONCELLOS, P.C.; SOLCI, M.C. Poluentes atmosféricos proveniente da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: Uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**. v.3, pg. 434-445, 2011.

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GARDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783–2788, 2002.

HAGERDAL, B., GARDONYI, M.; WAHLBOM, C.F.; van ZYL, W.H.; CORDERO OTERO, R.R.; JÖNSSON, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. v. 73, pg. 53-84, 2001.

HAHN-HAGERDAL, B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulosic hydrolysates. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 28/29, p. 131-144, 1991.

HICKE, L. Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. **FASEB Journal**. v. 11, n.14, pg. 1215-1226, 1997.

HIMMEL, M. E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**. v. 315, n. 5813, pg. 804-807, 2007.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n.2, pg. 300-372, 2002

HORÁK, J. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. **Biochimica Et Biophysica Acta**. v. 1614, n. 2, pg.139-155, 2003.

HOVSEPIAN, J. Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. **The Journal Of Cell Biology**, v. 216, n.6, pg. 1811-1831, 2017.

GAFFINEY, J.; MARLEY, N. The impacts of combustion emission on air quality and climate - From coal to biofuels and beyond. **Atmospheric Environment**. v. 43, n. 1 pg. 23-36, 2009.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 27, pg. 1-32, 1983.

JOJIMA, T.; OMUMASABA, C.A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n.3, p. 471-480, 2010.

KELLIS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 428, p. 617-624, 2004.

KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, n.6, p. 851-861, 2013.

KRAMPE, S.; STAMM, O.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. **FEBS Letters**. v. 441, n.3, pg. 343-347, 1998.

KRUCKEBERG, A. L. & BISSON, L. F. The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. **Molecular and Cellular Biology**. v. 10, p. 5903-5913, 1990.

KRUCKEBERG, A. The hexose transport family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**. v. 166, n.5, pg. 283-292, 1996.

A.L. Kruckeberg, L. Ye, J.A. Berden, K. van Dam, Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein, **Biochem. J.** v. 339, pg. 299-307, 1999.

KUYPER, M.; HARHANGI, H.R.; STAVE, A.K.; WINKLER, A.A.; JETTEN, M.S.; de LAAT, W.T.; den RIDDER, J.J.; op den CAMP, H.J.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. High level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Research** v.4, pg. 69-78, 2003.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**. v.104, n.3, pg. 229-242, 1993.

LIN, C.H.; MacGURN, J.A.; STEFANM C.J.; EMR, S.D. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. **Cell** v. 135, n.4, pg. 714-725, 2008.

LIN, Z. Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts. **Molecular Biology and Evolution**. v. 28, v.1, pg. 131-142, 2011.

LLOPIS-TORREGROSA, V.; FERRI-BLÁZQUEZ, A.; ADAM-ARTIGUES, A.; DEFFONTAINES, E.; van HEUSDEN, G.P.; YENUSH, L. Regulation of the yeast Hxt6 hexose transporter by the Rod1 alpha-arrestin, the Snf1 protein kinase and the Bmh 14-3-3 protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 291, n.29, pg.14973-14985, 2016.

MAIER, A. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. **FEMS Yeast Research**. v. 4, pg. 539-550. 2002.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 372-380, 2009

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 84, pg. 37-53, 2009a.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with genome-integrated NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n.11, pg. 3818-3822, 2009b.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Comparative study on a series of recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 48, n.6/7, p. 466–471, 2011.

MISHRA, P. & SINGH, A. **Microbial pentose utilization – Current applications in biotechnology**. v. 33, 1993.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresearch Technology**. v. 96, n.6, pg. 673-686, 2005.

MOYSÉS, D.N.; REIS, V.C.; DE ALMEIDA, J.R.; DE MORAES, L.M.; TORRES, F.A. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, p.207, 2016.

MÜLLER, G. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil**. 119 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2013.

NIKKO, E.; SULLIVAN, J.A.; PELHAM, H.R.B. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. **Scientific Report**. v. 9, pg. 1216-1221, 2008.

O'DONNELL, A. F.; McCARTNEY, R.R.; CHANDRASHEKARAPPA, D.G.; ZHANG, B.B.; THORNER, J.; SCHMIDT, M.C. Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and alpha-arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. **Molecular and Cellular Biology**. v. 57, n.6, pg. 939-955, 2015.

OREB, M.; DIETZM H.; FARWICK, A.; BOLES, E. Novel strategies to improve co-fermentation of pentoses with D-glucose by recombinant yeast strains in lignocellulosic hydrolysates. **Bioengineered**. v.3, n.6, pg. 347-351, 2012.

OZCAN, S. & M. JOHNSON. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced different levels of glucose. **Molecular and Cellular Biology**. v. 15, n.3, pg. 1564-1572, 1995.

PAIVA, S.; VIEIRA, N.; NONDIER, I.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; CASAL, M. URBAN-GRIMAL, D. Glucose-induced Ubiquitylation and Endocytosis of the Yeast Jen1 Transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p.19228-19236, 2009.

PELICANO, H.; MARTIN, D.S.; XU, R.H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**. v. 25, n.35, pg. 4633-4646, 2006.

REINFERBERGER, E. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **The FEBS Journal**. v. 254, pg. 324-333, 1997.

ROY, A.; KIM, Y.B.; CHO, K.H.; KIM, J.H. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. **Biochimica Et Biophysica Acta**. v. 1840, n.9, pg. 2878-2885, 2014.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**. v. 454, p. 841-845, 2008.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BETTIGA, M. Increased expression of the oxidative pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in anaerobically growing xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v.8, n.49, pg.1-12, 2009.

SALOHEIMO, A.; RAUTA, J.; STASYK, O.V.; SIBIMY, A.A.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, pg. 1041-1052, 2007.

SANTOS, F. A. Potencial da palha da cana-de-açúcar para produção de etanol. **Revista Química Nova (Sociedade Brasileira de Química)**. v. 35, 2012.

SEN, A.; ACOSTA-SAMPSON, L.; ALVARO, C.G.; AHN, J.S.; CATE, J.H.; THORNER, J. Internalization of Heterologous Sugar Transporters by Endogenous α -Arrestins in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, pg. 7074-7085, 2016.

SIMS, R.; TAYLOR, M. From 1st to 2nd generation biofuels technologies - An overview of current industry and RD&D activities. **International Energy Agency report**. 2008.

SNOWDOWN, C.; SCHIERHOLTZ, R.; POLISZCZUK, P.; HUGHES, S.; van der MERWE, G. ETP1/YHL010c is a novel gene needed for the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. **FEMS Yeast** v. 9, n.3, pg. 372–380, 2009.

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.M.; BON, E.P.S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 67, p. 918-926, 2008.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v.14, n.5, pg. 2-12, 2012.

TESFAW, A.; ASSEFA, F. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. **International Scholarly Research Notes**. v. 2014, 2014.

VERDUYN, C. Properties of the NAD(P)H-Dependent Xylose Reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **FEMS Yeast Research**. v. 3, p. 167-175, 1985.

Van VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, n.3, pg. 300-306, 2009.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W.; OLSSON, L. Deleting the paranitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose. **Metabolic Engineering**. v.10, p.360-369, 2008.

VICHI, F. M.; MANSOR, M.T.C. Energia, meio ambiente e economia: O Brasil no contexto mundial. **Revista Química Nova**. v.32, n.3, pg. 757-767, 2009.

WAHLBOM, C.F.; CORDERO OTERO, R.R.; van ZYL, W.H.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the Pentose Phosphate Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.2, pg. 740-746, 2003.

WILKINSON, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. **FASEB Journal**. v. 11, n.14, pg. 1245-56, 1997.

YOUNG, E.; LEE, S.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Fuels**. v.24, n.3, 2010.

YOUNG, E.; COMER, A.; HUANG, H.; ALPER, H. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n.4, pg. 401-411, 2012.

ZAH, R.; BINDER, C.; BRINGEZU, S.; REINHARD, J.; SCHMID, A.; SCHÜTZ, H. Future perspectives of 2nd Generation biofuels. **TA-SWISS Centre for Technology Assessment**. 2010.

ZHANG, F.; RODRIGUEZ, S.; KEASLING, J.D. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 22, p. 775-783, 2011.